

MÜNICH

1968

THESIS

Der Pasteur-Effekt und sein Reaktionsmechanismus
über die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse

Barbara v. Bock und Polach

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0049

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Th. Bücher

Der Pasteur-Effekt und sein Reaktionsmechanismus
Über die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara v. Bock und Polach
aus Au/Hallertau

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. E. Meyer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 13.2.68

Der Herrgott, der uns alle erschaffen hat,
der uns alle in seine Hand genommen hat,
der uns alle in seine Liebe genommen hat,
der uns alle in seine Gnade genommen hat.

Mein Herrgott, du bist der Herrgott,
der uns alle in seine Hand genommen hat,
der uns alle in seine Liebe genommen hat,
der uns alle in seine Gnade genommen hat.

Meinen Eltern gewidmet

Mein Herrgott, du bist der Herrgott,
der uns alle in seine Hand genommen hat,
der uns alle in seine Liebe genommen hat,
der uns alle in seine Gnade genommen hat.

Mein Herrgott, du bist der Herrgott,
der uns alle in seine Hand genommen hat,
der uns alle in seine Liebe genommen hat,
der uns alle in seine Gnade genommen hat.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Meyer in der Zeit von Juli 1962 bis Februar 1964 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Meyer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen und Hinweise, mit denen er mir bei Ausführung meiner Arbeit stets zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Für die Übernahme des Korreferates und das große Interesse an meiner Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. Theodor Bücher, Direktor des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität München zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Karlson, ehem. stellvertretender Direktor des Physiologisch-Chemischen Institutes für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und das Untersuchungsmaterial.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Entdeckung und Definition	1
Biologische Bedeutung	1
Entgleisung der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels in Tumoren	3
Theorien	4
Beschreibung der Versuche	
Darstellung von Muskelfaser-Fragmenten	19
Messung der Atmung des aufgeschlossenen Systems	19
Inkubationsversuche mit Muskelfaser-Fragmenten	19
Bestimmung des Glykogens	20
Bestimmung der Milchsäure	
a) chemische Bestimmung	21
b) enzymatische Bestimmung	22
Chemische und enzymatische Kreatinphosphatbestimmung und ATP-Bestimmung	23
Ergebnisse	25
Kopplung von Gärung und Atmung	28
Mechanismus der aeroben Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse	40
Bedeutung der Wasserstofftransportmetaboliten für die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse	56
Diskussion	70a
Zusammenfassung	70c
Literaturverzeichnis	71

Der Pasteur-Effekt und sein Reaktions-Mechanismus.
Über die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse.
Entdeckung und Definition.

Louis Pasteur (1-3) beobachtete zum ersten Male, daß in Zellen, die anaerob inkubiert wurden, nach Zufuhr von Sauerstoff die Atmung wieder einsetzt und die Gärung kleiner wird, manchmal sogar ganz verschwindet. Warburg (4) bezeichnete dieses Phänomen als Pasteur-Effekt. Der Pasteur-Effekt ist allen aerob lebenden Zellen eigentümlich, man trifft ihn nicht nur bei den einfachen Formen des Lebens, wie etwa den einzellern, sondern auch in höheren Organismen, in denen er von hormonellen oder nervösen Wirkungen noch überlagert sein kann.

Biologische Bedeutung

Die große biologische Bedeutung liegt in der Wirtschaftlichkeit dieses Vorganges. Die aerobe Verbrennung von Traubenzucker zu Kohlendioxyd und Wasser liefert eine Energie von 686 kcal/Mol, während die fermentative Spaltung zu Alkohol und Kohlendioxyd oder zu Milchsäure nur 56 bzw. 38 kcal/Mol beträgt. Die gärende Zelle muß deshalb das energetische Defizit des Elementarvorganges durch einen erhöhten Stoffumsatz ausgleichen. Ausgehend von diesem Ökonomieprinzip liegt die biologische Bedeutung der Pasteurschen Reaktion jedoch vor allem auf dem Gebiet der Steuerung des Energiestoffwechsels, entsprechend der Intensität der Lebensäußerungen. Es handelt sich um einen primitiven Regulationsmechanismus, wie Lynen (5) ihn bezeichnet. Dieser Regulationsmechanismus wird der Intensität der Lebensvorgänge durch sinnvolle Abstimmung der an-oxybiotischen und oxybiotischen Reaktionsschritte beim Abbau der Kohlenhydrate gerecht. Das rationellste Ver-

hältnis der Geschwindigkeit dieser Reaktionsschritte im stetigen Wandel der Stoffwechselintensität konstant zu erhalten, ist somit das eigentliche Problem der Regulation. Von Wagner (6-12) wurde zuerst erkannt, daß die Konstanterhaltung einer Zustandsgröße in der Biologie nach dem Prinzip der selbsttätigen Regelung erfolgt. Unter diesem Gesichtspunkt kann man das Geschwindigkeitsverhältnis der anoxybiotischen zu den oxybiotischen Reaktionsschritten, das konstant gehalten werden soll, als Regelgröße eines Regelkreises auffassen (13-15). Nach Wagner (13-15) besteht ein derartiger Regelkreis bei höheren Organismen aus biochemischen und physiologischen Baugliedern, die folgende Wechselwirkungen aufweisen: Geht eine Zelle in den Zustand höherer Leistung über, kann sich das Verhältnis der Stoffwechselprozesse derart zugunsten der anoxybiotischen Reaktionen verschieben, daß saure Intermediärprodukte auftreten. Diese wirken erweiternd auf die kapillaren Blutgefäße, welche die Zellen mit Sauerstoff versorgen. Durch das größere Sauerstoffangebot wird der oxybiotische Stoffwechsel angeregt und so die Voraussetzung für die unökonomische Bildung saurer Intermediärprodukte aus anoxybiotischen Reaktionen beseitigt. Einen Vorgang dieser Art nennt der Physiologe nutritive Kreislaufregulierung. Er zeigt, wie ein im Fließgleichgewicht befindliches Stoffwechselsystem von seinem Ausstoß auf seinen Eingang mit Gegenkopplung rückgekoppelt ist.

Entgleisung der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels in Tumoren (16).

Der Abbau der Kohlenhydrate nach dem Embden-Meyerhof-Schema und die weitere Oxydation erfolgt in Tumoren auf dem gleichen Wege wie in normalen Geweben. Glykolyse, oxydativer Abbau der Brenztraubensäure im Citronensäurezyklus, der Elektronentransport in der Atmungskette und die oxydative Phosphorylierung sind auch in Tumoren nachgewiesen worden. Die bisher gefundenen Unterschiede im Kohlenhydratstoffwechsel (17-18), die zwischen Tumor- und normalen Zellen bestehen, sind quantitativer und nicht qualitativer Art. Normalerweise wird aerob die Glykolyse und die Anhäufung von Milchsäure durch Sauerstoff weitgehend unterdrückt (Pasteur-Effekt). Obwohl die Aufnahme von Sauerstoff die Atmung in Tumoren (19) von gleicher Größe ist wie in vielen normalen Geweben, zeichnet sich die Tumorzelle durch eine hohe aerobe Glykolyse aus. Die Bildung von Brenztraubensäure über den Embden-Meyerhof-Weg erfolgt schneller, als die Oxydation dieses Metaboliten, so daß eine Anhäufung von Milchsäure im Krebsgewebe erfolgt. Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels, die als Pasteur-Effekt in Erscheinung tritt, ist offensichtlich in Tumoren weitgehend gestört.

Tabelle 1 Glykogen und Milchsäure. Analysen von normalen Geweben und Tumoren (20).

x Milchsäure: Werte in $\mu\text{Mol}/100\text{ g}$
 xx Glykogen als Hexose

Komponenten		Milchsäure ^x	Glykogen ^{xx}
Normale Gewebe	Muskel (Ratte)	188	3480
	Leber (Ratte)	230	28450
Primäre Tumoren	prim. Lebercarcinom (Ratte)	582	462
	menschl. Brustcarcinom	1545	1600
Transplantierte Tumoren	Walker-Carcinom 256	824	65
	Jensen-Sarkom	637	43

Betrachtet man den Energiestoffwechsel der normalen Zelle, gärenden Zelle und Tumorzelle, so zeigt sich, daß die normale Zelle ihre Energie in Form der energiereichen Verbindung ATP zum größten Teil aus der Atmungskettenphosphorylierung und nur zum geringen Teil aus der Substratphosphorylierung gewinnt; insgesamt entstehen beim aeroben Abbau 38 ATP pro Mol Glucose.

Die anaerobe Glykolyse erscheint mehr als Ausweg für die schlecht mit Sauerstoff versorgten Zellen; es entstehen beim Abbau pro Mol Glucose zu Milchsäure durch Substratphosphorylierung nur 2 ATP. Die gärende Zelle versucht durch erhöhten Stoffumsatz ihren Energiehaushalt auszugleichen. Das energiereiche Phosphat in Tumorzellen stammt etwa zu gleichgroßen Teilen aus der oxydativen Phosphorylierung und der Glykolyse; in Zellen des Ehrlich-Ascites-tumors liefert die oxydative Phosphorylierung nur etwa 30% und die glykolytische Phosphorylierung 70% des energiereichen Phosphates. Als Erklärung hierfür dient einmal eine geringe Aktivität der mitochondriengebundenen Enzyme durch eine geringere Zahl der Mitochondrien in den Tumorzellen; in anderen Fällen kann aber auch eine absolute Verminderung der mit den Mitochondrien assoziierten Enzyme vorliegen. Darüberhinaus sind Mitochondrien aus Tumoren empfindlicher (21-22) und unterschiedlich in ihrem Feinbau (23-24) im Vergleich zu Mitochondrien aus normalen Geweben.

T h e o r i e n

Aisenberg und Potter (25) haben nachgewiesen, daß die Pasteursche Reaktion nicht durch eine rückläufige Synthese des Kohlenhydrates zustande kommt. Ihre Ursache ist vielmehr darauf zurückzuführen, daß bei Gegenwart von Sauerstoff die Bildung der anaeroben Spaltprodukte gehemmt ist.

Diese Ansicht - zuerst von Hahn (26-28) auf Grund von kinetischer Untersuchungen vertreten - ist heute gefestigte Grundlage aller Studien über den Mechanismus dieser Reaktion. Warburg (4,29-30) hat gezeigt, daß nicht der Sauerstoff als solcher hemmend wirkt. Wird nämlich die Atmung durch Kohlenmonoxyd oder Blausäure inaktiviert, so bleibt die Gärung erhalten, obwohl der Sauerstoff nach wie vor Zutritt zu den Zellen hat. Es sei also der Atmungsprozeß selbst oder ein unmittelbar mit ihm verknüpfter Vorgang, der die Gärung beeinflusst.

Es ist heute bekannt, daß die vollständige Oxydation der Kohlenhydrate mit den gleichen chemischen Umsetzungen eingeleitet wird, wie die Gärung. Es besteht nun die Frage, warum Reaktionen, die unter der Wirkung spezifischer Enzyme stehen, in atmenden Zellen langsamer als in gärenden Zellen ablaufen. Das Grundphänomen, durch welches die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen in den Zellen bestimmt wird, ist das Wechselspiel zwischen Substrat und Enzym. Die Mengen an Substrat und aktivem Enzym begrenzen den Umsatz, so daß jegliche Veränderung der Substratkonzentration (siehe I) oder der Enzymaktivität (siehe II) - falls sich dies unterhalb des Sättigungsbereiches abspielt - die Geschwindigkeit beeinflussen muß. Diese Grundtatsachen wurden im Laufe der letzten drei Jahrzehnte zur Erklärung des Pasteur-Effekts herangezogen.

I

Auf die Tatsache, daß an bestimmten chemischen Reaktionen des Atmungs- und Gärungs-Systems die gleichen Substrate und zwar ATP, ADP und anorganisches Phosphat teilnehmen, stützen sich jene Theorien, die den Pasteur-Effekt durch Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit im Embden-Meyerhof-System infolge von Substratverminderung erklären. Lynen (31-32) und Johnson (33) haben 1941 unabhängig voneinander eine Theorie aufgestellt, welche den Pasteur-

Effekt auf die Konkurrenz von Atmung und Gärung um das anorganische Phosphat und das Adenosindiphosphat zurückzuführen. Lynen (5,31-32, 34-39) und Holzer (40-47) fanden bei Versuchen mit Hefezellen, daß bei Gegenwart von Sauerstoff durch Vorgänge der Atmungskettenphosphorylierung viel mehr anorganisches Phosphat in organische Bindung übergeführt wird als bei dessen Abwesenheit; weiterhin wird als Folge der oxydativen Phosphorylierung die Penetration von Orthophosphat aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien soweitgehend beschleunigt, daß eine erhebliche Konzentrationssteigerung in diesen strukturierten Zellelementen eintritt. Die für das Enzymsystem des Embden-Meyerhof-Systems verfügbare Menge an anorganischem Phosphat nimmt ab und somit wird die phosphaterfordernde Überführung 3-Phosphoglycerinaldehyd in 1,3,-Diphosphoglycerinsäure weitgehend verlangsamt. Holzer (46) nannte die geschwindigkeitsbegrenzende Funktion des Orthophosphates bei der Dehydrierung des Triosephosphates in lebenden Hefezellen "Orthophosphatbremse".

Gatt, Wu und Racker (48-54), die mit einem rekombinierten System arbeiteten, bestehend aus gereinigten glykolytischen Enzymen, Coenzymen und atmenden Mitochondrien, vermochten den Pasteur-Effekt in diesem System dadurch hervorzurufen, daß sie einmal die Menge an nutzbarem ADP und zum anderen die Menge an anorganischem Phosphat begrenzten.

Konkurrieren die beiden Enzymsysteme der mitochondrialen Atmungskette und des Embden-Meyerhof-Systems um ADP und war dies nur begrenzt verfügbar, fanden sie zwar eine Hemmung der Milchsäurebildung, der Hexoseverbrauch aber blieb unverändert und eine Anhäufung von Fructosediphosphat trat auf. Sie erklärten, daß ATP, das in großer Menge in atmenden Mitochondrien gebildet wird, für den Hexoseabbau zur Verfügung steht, während das von beiden Enzym-Systemen beanspruchte ADP, die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxyda-

tion von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 3-Phosphoglycerat herabsetzt. Wählten sie die Versuchsbedingungen so, daß anorganisches Phosphat begrenzt vorhanden war, war in Gegenwart von Mitochondrien der Glycose-Abbau zu 40% und die Milchsäurebildung zu 70% gehemmt; daraus folgerten sie: Ist der Vorrat an anorganischem Phosphat, das von beiden Enzymsystemen einmal zur Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd zum anderen zur oxydativen Phosphorylierung benötigt wird, erschöpft, findet keine Regeneration von ATP mehr statt; es ist demnach infolge eines ATP-Mangels auch der Glucoseabbau gehemmt. Gatt, Wu und Racker (48-54) wiesen jedoch auf Unterschiede zwischen dem Pasteur-Effekt in intakten Zellen und einem rekombinierten System hin und kamen zu dem Schluß, daß der Pasteur-Effekt dort studiert werden sollte, wo er zuerst entdeckt worden ist - in lebenden Zellen.-

Nach Chance und Hess (55-62) besteht unter aeroben Bedingungen eine höhere Affinität der Mitochondrien zu ADP, als sie der cytoplasmatische Raum einschließlich des Reaktionsortes der Phosphoglyceratkinase aufweist. Den Mitochondrien ist so die Möglichkeit gegeben die Reaktionsgeschwindigkeit im Embden-Meyerhof-System zu kontrollieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd wird durch anorganisches Phosphat weniger wirksam beeinflusst, da die Affinität der Mitochondrien zu anorganischem Phosphat im Vergleich zu ADP wesentlich geringer ist.

Bisher konnte gezeigt werden, daß aerob durch Mangel an anorganischem Phosphat und ADP die Überführung von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 3-Phosphoglycerat weitgehend verlangsamt wird; durch die Hemmung dieses Teilschritts ist auch die Bildung von DPNH und Brenztraubensäure vermindert, so daß die Reaktionsprodukte durch direkte Oxydation in den Mitochondrien entfernt werden, bevor eine Reduktion zu Milchsäure stattfindet. Dieser Mechanismus

erklärt nach Lynen (5,34-39) nur warum aerob die Milchsäurebildung gehemmt ist, nicht jedoch warum aerob auch der Kohlenhydratabbau herabgesetzt ist.

Holzer (44) konnte bei Arbeiten mit Hefezellen zeigen, daß beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen keine Veränderungen der ATP Konzentration eintritt, woraus gefolgert wurde, daß eine intrazelluläre ATP-Verschiebung vorhanden sein muß. Aerob verarmt das Cytoplasma an ATP, während in den Mitochondrien, dem Ort der aeroben ATP-Synthese, ATP angehäuft wird. Lynen (5) ist der Meinung: ist für die Umwandlung von Glucose in Fructosediphosphat nur das im Cytoplasma durch Gärungsvorgänge gebildete ATP verfügbar, so ist die niedere Hexosediphosphat-Konzentration in Anwesenheit von Sauerstoff durch den Mangel an cytoplasmatischen ATP bedingt. Die verminderte Glucoseaufnahme unter Sauerstoff wäre somit Ausdruck eines ATP-Transportphänomens, ausgelöst durch eine verringerte Gärung auf Grund eines Mangels an Orthophosphat. Auch Wu und Racker (49) nehmen an, daß die Phosphorylierung der Glucose durch ATP aus den Mitochondrien verhältnismäßig langsam erfolgt.

Ebenso weisen Chance und Hess (57,62-63) darauf hin, daß ein Mechanismus besteht, der das in den Mitochondrien neugebildete ATP zurückhält; nach einem Zusammenbruch der ATP-Retention durch ein entkoppelndes Agens, trat in Ascites-Tumorzellen eine sofortige Aktivierung der Atmung und des Glucoseabbaues ein.

Der Versuch, die verschiedenen Symptome des Pasteur-Effekts aus der gleichen Ursache zu erklären, scheint nach Ansicht von Lynen (5) möglicherweise zu weitgehend. Er gibt jedoch zu bedenken, daß der Biochemiker die Existenz getrennter Räume in lebenden Zellen nicht mehr übersehen darf und strukturelle Faktoren zur Erklärung metabolischer Regulationen heranziehen kann.

Nach Hess (63-65) kann der Stoffwechsel der Zelle als ein offenes System von chemischen Prozessen in einem membranstrukturierten Raum betrachtet werden. Von außen strömen Substanzen ein, Endprodukte werden abgegeben. An den Grenzflächen spielen sich Transportvorgänge ab. In der Zelle sind Ketten von chemischen Reaktionen durch Verzweigungen und zyklische Prozesse miteinander in kaum übersehbarer Weise vernetzt. Die Fließgleichgewichte der Zelle begegnen dem Beobachter zunächst in Form von Konzentrationen zellulärer Intermediate aller Substanzklassen, und nichts als rasche Einfuhr oder Ausfuhr von Metaboliten aus der Zelle verrät die geordnete molekulare Bewegung und den Fluß der Stoffe. Die stationären Konzentrationen halten solange an, wie alle exogenen und endogenen Bedingungen des Systems konstant bleiben. Ändert sich nun ein Parameter des Systems oder tritt ein neuer hinzu, so geht das System in einen neuen stationären Zustand solange über, wie die neuen Bedingungen erhalten bleiben.

Es lassen sich bei den energieliefernden Reaktionen der Zelle zwei extreme stationäre Zustände als Ruhestatus und Aktivität definieren, die durch große Unterschiede von Flußraten und stationären Konzentrationen gekennzeichnet sind. Der Wettbewerb verschiedener Enzyme um gemeinsame Intermediate führt zu Engpässen im Stoffwechsel. Diese stellen die Kontrollpunkte des Durchflusses dar und führen zur Ausbildung kinetischer Kreuzungspunkte. Man erkennt sie, wenn man die stationären Konzentrationen der Metaboliten analysiert und prüft, ob unter verschiedenen Flußbedingungen die jeweiligen Partner einer enzymatischen Reaktion nahe dem Massenwirkungsgleichgewicht und damit nahezu reversibel fließen oder durch hohen Fluß erheblich, zum Teil um Größenordnungen entfernt vom Massenwirkungsgleichgewicht gehalten sind und damit quasi-irreversible limitierende Schritte für eine Flußrichtung darstellen.

Hess (64) zeigt, daß bei Ascites-Tumorzellen die Reaktionen der Phosphorylase, Phosphoglucomutase, Phosphohexoisomerase, Aldolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratmutase, Enolase und Adenylatkinase nahe dem Massenwirkungsgleichgewicht und zwar über einen großen Bereich von Flußraten verlaufen; ähnliche Verhaltensweise wird auch für die Dehydrogenasen angenommen. Im Gegensatz zu dieser Gruppe von Reaktionen ist der Lauf der phosphatübertragenden Reaktionen z.B. die Phosphofructokinase, in geringerem Maß die Phosphoglyceratkinase und die Pyruvatkinase zum Teil weit vom Gleichgewichtszustand verschoben und somit limitierend für diese Flußrichtung. In Anwesenheit hoher Konzentrationen von Glucose muß die Hexokinasereaktion in diese Gruppe eingeordnet werden.

Der Fluß wird durch den stationären Spiegel von Fructose-6-phosphat, Diphosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, ATP und ADP sowie Glucose als exogenes Substrat bestimmt. Da der Substratdruck durch die Glucose erzeugt wird, ist die Fließgeschwindigkeit eine Abhängige der Konzentration von ATP und ADP, die zugleich Kontrollparameter der oxydativen Phosphorylierung sind. Bei der Sättigung der Atmungskette mit Substraten und Sauerstoff lassen sich zwei typische Zustände definieren: Der "aktive" Zustand ist als Fließgleichgewicht durch einen raschen Elektronenfluß in Richtung zum Sauerstoff charakterisiert und wird durch einen Überschuß an ADP und anorganisches Phosphat mit dem Nettoeffekt einer ATP Synthese erzeugt. Der "inaktive" Zustand ist als Quasi-Gleichgewicht durch einen Fast-Stillstand des Elektronenflusses in Richtung zum Sauerstoff charakterisiert und wird durch einen relativen Mangel an ADP und anorganischem Phosphat sowie einen Überschuß an ATP eingestellt. Beide Zustände der Atmungskette werden damit durch das ATP-System kontrolliert. Beobachtungen von Übergangszuständen bei denen der Fluß der Glykolyse zugleich betroffen ist weisen darauf hin, daß das ATP-System der koordinierende Partner beider Prozesse ist,

wobei die Affinitäten von ATP und ADP und anorganischem Phosphat zu den jeweiligen Reaktionsorten entscheiden, wie groß der Fluß durch das eine oder andere System ist.

II

Meyer (66) zeigte in seinen Arbeiten, daß aerob eine Hemmung des Glykogenabbaues vor der ersten Phosphorylierungsstufe besteht, also bei der Überführung von Glykogen zu Glucose-1-phosphat. Es wird angenommen, daß das Enzymsystem der Phosphorylase durch Oxydationsreaktionen der mitochondrialen Atmungskette inaktiviert und somit der aerobe Glykogenabbau gehemmt wird.

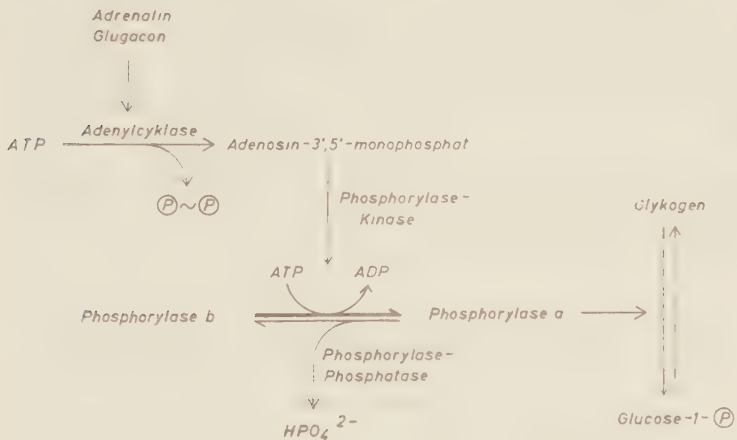


Abb. 1 Schema über die Umwandlung von Phosphorylase b zu a (67).

Morgan und Parmeggiani (68-72) stellten experimentell in einem mit substratfreiem Puffer durchströmten Herzen aerob eine geringe Glykogenolyse fest, die Milchsäurebildung war ebenfalls gering. Die Phosphorylase lag zum größten Teil in b Form vor. Nach Zugabe von Glucagon zu einem aerob perfundiertem Herzen wurde die Glykogenolyse aktiviert, das Glykogen des Herzens nahm ab, die Milchsäurebildung stieg an und man fand vermehrt Phosphorylase a. Bei Zusatz von Glucagon war ungefähr 50 % der Phosphorylase b in a übergeführt worden; in diesem Falle erfolgte die Umwandlung von Phosphorylase b in a durch die Phosphorylasekinase, die durch 3'-5'-Adenosinmonophosphat aktiviert worden war; der Glykogenabbau jedoch verlief langsamer als anaerob, wo über einen noch unbekannten Mechanismus nur ungefähr 30 % Phosphorylase a gebildet worden waren. Es wird angenommen, daß anaerob eine Konzentrationsänderung von AMP, ATP und anorganischem Phosphat für den vermehrten Glykogenabbau verantwortlich sind.

Beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen änderten sich die intrazellulären Metabolitkonzentrationen innerhalb von 2 Minuten.

Tabelle 2 Metabolitkonzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen (70).

	aerob $\mu\text{Mol/ml}$	anaerob $\mu\text{Mol/ml}$
AMP	0,17	0,89
ATP	7,5	6,3
anorg. Phosphat	3,0	9,0
AMP/ATP	0,023	0,14

Vergleicht man die aerob und anaerob ermittelten Metabolitkonzentrationen, so stieg anaerob die Konzentration von AMP um das 5-fache, während der Spiegel an ATP etwas ab-

nahm und die Werte für anorganisches Phosphat erhöhten sich um das 3-fache. Der Vorgang war reversibel, kehrte man zu aeroben Versuchsbedingungen zurück.

Bei Zusatz von Glucagon stieg der Glucose-6-phosphat-spiegel unter aeroben Bedingungen um das 10-fache; anaerob ohne Glucagon um das 4-fache. Der Hexosemonophosphatverbrauch war anaerob beschleunigt, da unter diesen Bedingungen auch eine Aktivierung der Phosphohexokinase eintrat.

Weitere Versuche zeigten, daß die Aktivität der Phosphorylase b durch Konzentrationsänderungen der Metabolite AMP, ATP, H_3PO_4 + Glucose-6-phosphat, die man auch als Effektoren bezeichnet, beeinflußt wird. Die Phosphorylase b konnte im Gegensatz zur Phosphorylase a durch AMP aktiviert werden. Diese Aktivierung wurde entweder durch ATP oder Glucose-6-phosphat oder beide zusammen blockiert, während die Aktivität von Phosphorylase a unbeeinflußt blieb. Da diese Effektoren die Aktivität der Phosphorylase a nicht verändern, und außerdem der aerob ermittelte AMP/ATP Quotient eine Aktivierung der Phosphorylase b vermindert, können diese Ergebnisse zur Erklärung dienen, warum aerob bei Zugabe von Glucagon, obwohl 50 % Phosphorylase a nachgewiesen wurden die Glykogenolyse langsamer als anaerob verläuft.

Nach Meinung von Morgan und Parmeggiani (68-72) kommt also der vermehrte Glykogenabbau anaerob 1) durch Zunahme der Konzentration an Phosphorylase a zustande, die über einen noch unbekannten Mechanismus vermehrt gebildet wird; 2) durch Erhöhung der Konzentration an intrazellulären Akt. toren AMP und anorganischem Phosphat, die die Phosphorylase b in die aktive Form überführen; und 3) durch Abnahme der ATP- und Glucose-6-phosphatkonzentration, die diesen Metaboliten wird eine hemmende Funktion bei der Umwandlung von inaktiver Phosphorylase b in ihre aktive Form zugeschrieben.

Nach der Vorstellung von Passonneau und Lowery (73) ist die Phosphofructokinase ein Schrittmacherenzym der Glykolyse; bei einer Hemmung des Enzyms erfolgt ein Anstauung von Glucose-6-phosphat, wodurch sowohl die Aktivierung der Phosphorylase b durch AMP als auch die Aktivierung der Hexokinase verhindert wird. Die Aktivität der Phosphofructokinase wird durch Aktivatoren, Inhibitoren und Deinhhibitoren gesteuert.

Tabelle 3 Substrate die die Aktivität der Phosphofructokinase beeinflussen.

Inhibitoren	Aktivatoren	Deinhhibitoren von ATP, Zitrat, Mg^{++}
ATP	NH_4^+	FDP
Zitrat	K^+	3',5'-AMP
Mg^{++}	H_3PO_4	5'-AMP
	5'-AMP	ADP
	3',5'-AMP	F-6-P
	ADP	H_3PO_4
	FDP	

Betrachtet man die kinetischen Eigenschaften der Phosphofructokinase, so scheint es wahrscheinlich, daß der normalerweise in der Zelle vorhandene ATP-Zitrat Spiegel bewirken, daß die Phosphofructokinase fast ausschließlich in ihrer inaktiven Form vorliegt, solange der Spiegel an anorganischem Phosphat, AMP und Fructosediphosphat niedrig bleibt. Erst eine intrazelluläre Konzentrationsänderung der Effektoren, z.B. eine Abnahme der ATP-Konzentration, oder ein Anstieg von AMP, anorganischem Phosphat und Fructosediphosphat, führen zu einer Aktivierung der Phosphofructokinase.

Lipmann (74-77) vertritt die Auffassung, daß der Pasteur-Effekt durch eine oxydative Hemmung der glykolytischen Fermentaktivität ausgelöst wird. Seine Versuche veranlaßten ihn zu der Annahme, daß irgend ein Enzym mit SH-Gruppen, das ein Teilschritt der Glykolyse katalysiert, reversibel durch das Zusammenwirken von Sauerstoff mit gewissen Redoxsystemen über das autoxydable Atmungsferment inaktiviert wird und so den Pasteur-Effekt auslöst.

Hatch und Turner (78-81) wählten für ihre Studien teilweise gereinigten Erbsensamenextrakt, dem sie die Co-faktoren ATP, DPN und Mg^{++} Ionen zusetzten. Sie zeigten, daß ein vollständiges Embden-Meyerhof-System vorhanden ist, denn dieses System baute Stärke, Hexose und Hexosephosphate zu Kohlendioxyd und Äthanol ab. Auch die theoretische Forderung der Bildung 2 Moleküle ATP pro Molekül CO_2 wurde erfüllt; dies beweist, daß die 3-Phosphoglycerinsäurekinase und Pyruvatkinase das energiereiche Phosphat ATP liefern. Dieses einfache System wird nicht durch Atmungsprozesse kompliziert. Aerob wurde nur eine geringe Sauerstoffaufnahme bemerkt. Trotzdem fand man Unterschiede in der glykolytischen Aktivität nach aerober und anaerober Inkubation dieses Systems. Anaerob wurde mehr Hexose abgebaut, CO_2 und Äthanol gebildet als aerob. Die Wirkung von Sauerstoff auf das Enzymsystem wird als ein dem Pasteur-Effekt ähnlicher Mechanismus gedeutet. Man vermutet, daß Sauerstoff die Glykolyse in Erbsensamenextrakt durch Inaktivierung eines der glykolytischen Enzyme hemmt. In diesem System konnte die aerobe Hemmung der Glykolyse durch Sauerstoffentzug oder durch Zugabe von DPN aufgehoben werden; bei einer Konzentration von 15 μ Mol DPN/2,3 ml betrug die aerobe Hemmung der Glykolyse noch 90 % bei 100 μ Mol DPN/2,3 ml erreichte der Glucoseabbau, CO_2 - und Äthanolbildung anaerobe Werte. Ähnlich beeinflusste Cystein und reduziertes Glutathion die aerobe Glykolyse. Eine Untersuchung

der Aktivitätsänderung verschiedener Enzyme zeigte, daß die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (= GAPDH) anaerob ihre Aktivität nicht änderte, während aerob innerhalb einer Std. mehr als 60 % des Enzyms inaktiviert wurden. Die Zugabe einer hohen Konzentration von kristalliner GAPDH hob aerob die Hemmung der Glykolyse auf.

Anaerob erreichte der Protein-SH-Gruppenspiegel ebenso wie die Glykolyse ein Maximum, während nur eine geringe DPN-Konzentration ermittelt wurde. Die Autoren konnten zeigen, daß durch Oxydation wichtiger Sulfhydryl-Gruppen GAPDH inaktiviert wurde, aktiviert durch Reduktion von Disulfid-Gruppen in Gegenwart von reduzierten Diphosphopyridinnucleotid oder von Systemen die reduziertes Di- bzw. Triphosphopyridinnucleotid bilden. Da 100 μ Mol DPN/2,3 ml und mehr die aerobe Glykolyse aufheben, wird angenommen, daß bei dieser kritischen Konzentration von DPN die Reduktion von S-S-Gruppen schneller verläuft als die Oxydation von SH-Gruppen.

Das folgende Schema (81) soll den vermutlichen Mechanismus der reversiblen aeroben Hemmung der Glykolyse in Erbsensamenextrakt zeigen.

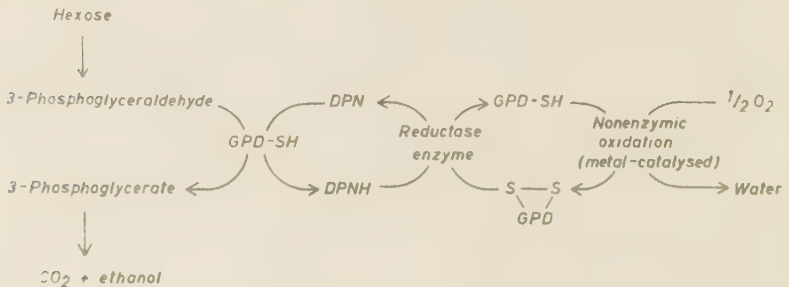


Abb. 2 Reaktionsschema über die Steuerung der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Reaktion.

GPD = Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase aktive (SH) und inaktive (S-S-)Form.

Aisenberg, Reinafarje und Potter (25,82-84) untersuchten den Pasteur-Effekt an einem zusammengesetzten System, bestehend aus löslichen Anteilen von Rattenhirn und Rattenleber-Mitochondrien. Sie fanden, daß Mitochondrien, die die Cytochromkette und Cytochromreduktase enthalten, einen Glucoseabbau und eine Milchsäureanhäufung verhindern. Sogar Mitochondrien, in denen keine oxydative Phosphorylierung stattfand, hemmten die Glykolyse. Sie glaubten, daß der Pasteur-Effekt von dem elektronentransportierenden System der Mitochondrien und nicht von den Reaktionen der oxydativen Phosphorylierung beeinflusst wird. Auf Grund ihrer Versuche kamen sie zu dem Ergebnis, daß die Mitochondrien die Glykolyse zu Beginn des Glucoseabbaues hemmen und zwar auf der Stufe der Phosphohexokinase- und der Phosphofructokinase-Reaktion. Sie machen jedoch darauf aufmerksam, daß die von ihnen gezogenen Schlußfolgerungen nur für den sog. mitochondrialen Pasteur-Effekt des künstlichen Systems gelten, dessen Identität mit dem Pasteur-Effekt des morphologisch intakten Zellsystems nicht erwiesen ist.

Balázs und Richter (85-91) stellten ihr System aus Mitochondrien und Überstand aus Gehirn von Ratten zusammen. Das Ausmaß der aeroben Hemmung des Glucoseabbaues hing von den Cofaktoren ATP, ADP und DPN ab. Fehlgaben die Cofaktoren, so stieg die Hemmung der aeroben Milchsäurebildung aus Glucose auf 90 % an. In Gegenwart der Cofaktoren war aerob der Glykoseverbrauch größer, als sich durch die CO_2 - und Milchsäurebildung erklären ließe. Man fand eine beträchtliche Anhäufung von Fructose-1-6-phosphat und Glucose-6-phosphat. Die Entstehung der Phosphoglycerate und Milchsäure war in gleicher Größenordnung gehemmt. Sie schlossen an, daß die aerobe Hemmung der Milchsäurebildung in diesem System unterhalb der Fructosediphosphatreaktion und zwar an der GAPDH angreift. Diese Annahme wurde bestätigt, da ein Zusatz von kristalliner GAPDH die aerobe Hemmung aufhob. In diesem System konnte die aerobe Hem-

mung der Glykolyse nur durch den Wechsel der Gasphase von Sauerstoff zu Stickstoff und weder durch Blockierung der Atmungskette noch durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung aufgehoben werden.

Enthielt das System keine Cofaktoren kam die Hemmung der aeroben Milchsäurebildung durch Mangel an verfügbarem ATP und ADP zustande, wie Chance, Hess und Lynen in ihren Arbeiten berichtet haben. Hier konnte die aerobe Hemmung der Glykolyse durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung und Blockierung der Atmungskette aufgehoben werden. Nach Balázs und Richter (85-91) erfolgt die aerobe Hemmung der Glykolyse einmal über die Inaktivierung des Enzyms GAPDH und zum anderen über Reaktionen oxydativer Phosphorylierung der Atmungskette.

Beschreibung der Versuche

Darstellung von Muskelfaser-Fragmenten

Nackenmuskulatur vom Stier wird kurz nach der Schlachtung entnommen und auf etwa 8°C gekühlt. Anschließend wird das von Sehnen, Fascien und Fett befreite Gewebe durch einen gekühlten Fleischwolf getrieben, der mit einer Siebplatte von 2 mm Lochweite ausgerüstet ist.

Messung der Atmung des aufgeschlossenen Systems

Die Atmung der Muskelfaser-Fragmente wird manometrisch nach Warburg (92) gemessen. Als Reaktionsgefäße dienen 15 ml-Tröge, in denen 0,5 g aufgeschlossener Muskel mit 1,7 ml Phosphatpuffer ($5,9 \times 10^{-2}\text{M}$; pH 7,0) und 1 ml dest. Wasser bei 22°C inkubiert werden. Gegenüber einem Ansatz dieser Art, der als Kontrolle dient, enthalten die anderen Gefäße anstelle von 1 ml dest. Wasser 1 ml einer Lösung verschiedener Stoffe (siehe Versuchsergebnisse). Alle Ansätze werden vor Versuchsbeginn 10 Min. mit Sauerstoff durchströmt.

Inkubationsversuche mit Muskelfaser-Fragmenten

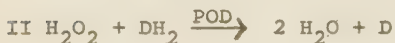
Ansatz: 15 g Muskelfaserfragmente, 15 ml dest. Wasser bzw. 15 ml einer Lösung verschiedener Stoffe und 15 ml Phosphatpuffer ($5,9 \times 10^{-2}\text{M}$; pH 7,0) in Reaktionsröhren von 250 ml Inhalt. Phosphatgehalt der intrazellulären wasserlöslichen Phase des biologischen Systems nach Konzentrationsausgleich mit dem Milieu ($\text{pt}^{22x} = 2,3$): $3,5 \times 10^{-2}\text{M}$. Zu einer Versuchsreihe gehören: Ein Ansatz zur Bestimmung der bei Beginn der Inkubation vorhandenen Substrate (direkter Versuch), ein zweiter zur Bestimmung der Substrate nach Inkubation im Vakuum (anaerober Versuch), ein dritter zur Bestimmung der Substrate nach Inkubation im Sauerstoff (aerober Versuch).

* Osmotischer Druck bei 22°C .

Mit Ausnahme des direkten Versuchs werden alle Ansätze 2 Stdn. in einem Thermostaten bei 22° C unter langsamer Bewegung inkubiert.

Bestimmung des Glykogens (93)

Die Versuche werden mit festem Kaliumhydroxyd unterbrochen und 2 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Zur Ausfällung des Glykogens wird Äthanol bis zu einer Endkonzentration von etwa 48 % zugesetzt. Der Niederschlag wird mit Äthanol umgefällt und gewaschen. Das abgetrennte Glykogen wird mit Salzsäure (2,2 % HCl Endkonz.) 2 Stdn. im siedenden Wasserbad hydrolysiert, anschließend neutralisiert. Ein aliquoter Teil dient zur enzymatischen Glucosebestimmung, die nach folgendem Prinzip durchgeführt wird (94):



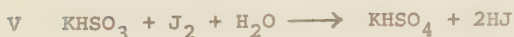
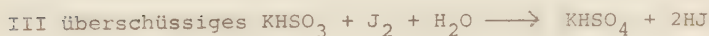
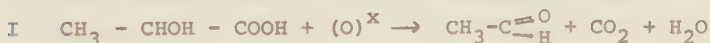
Das Enzym Glucose-Oxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von Glucose zum Gluconolacton, das weiter mit Wasser zu Gluconsäure reagiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) wird in gekoppelter "Indikatorreaktion" weiter umgesetzt. Wasserstoffperoxyd oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator "DH₂" (z.B. o-Dianisidin), der dabei in den rotbraunen Farbstoff "D" übergeht.

Die Menge des braunen Farbstoffes ist also ein Maß für die umgesetzte Glucose-Menge. Da die Reaktionen quantitativ ablaufen und GOD spezifisch auf D-Glucose eingestellt ist, handelt es sich hier um eine Bestimmungsmethode für "wahre Glucose". Der Farbstoff wird bei 436 mμ kolorimetriert.

Bestimmung der Milchsäure

a) chemische Bestimmung (95)

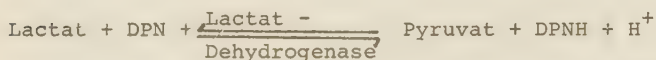
Die Versuche werden mit 4,4%iger Salzsäure und gesätt. Sublimatlösung unterbrochen. Zur vollständigen Entweißung bleiben die Ansätze über Nacht im Eisschrank stehen. Das Filtrat wird stark alkalisiert und die vorhandenen Kohlenhydrate durch Kupfer-Kalkfällung entfernt. Ein aliquoter Teil des Filtrats dient zur Bestimmung der Milchsäure nach der Methode von Friedemann, Cotonio und Shaffer (95). Die Milchsäure wird durch Permanganat in schwefelsaurer Lösung zu Acetaldehyd oxydiert. (I) und dieser aus dem Reaktionsgemisch in eine Vorlage mit überschüssiger Kaliumbisulfitlösung destilliert, wo er als Bisulfitverbindung gebunden wird (II). Das überschüssige Bisulfit wird durch die genau erforderliche Menge Jodlösung zu Bisulfit oxydiert (III). Nunmehr wird durch Natriumbikarbonat die Bisulfitaldehydverbindung zerlegt (IV) und das freiwerdende Bisulfit wieder durch eine eingestellte Jodlösung bestimmt (V). Der durchschnittliche Fehler der Methode beträgt -1,91%.



x Permanganat

b) enzymatische Bestimmung (96)

Die Ansätze werden mit 0,6 m Perchlorsäure enteiweißt und zur weiteren Aufschließung des Systems mit einem Ultraturax homogenisiert. Anschließend werden sie 10 Min. in ein Eisbad von 0° C gestellt und filtriert. Einem aliquoten Teil des Filtrates wird zur Perchloratfällung ein Puffer bestehend aus 0,8 m Triäthanolamin und 1,4 m Kaliumkarbonat zugesetzt. Die Ansätze werden abermals 10 Min. in ein Eisbad von 0° C gestellt und filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrates dient zur enzymatischen Milchsäurebestimmung, die nach folgendem Prinzip durchgeführt wird:

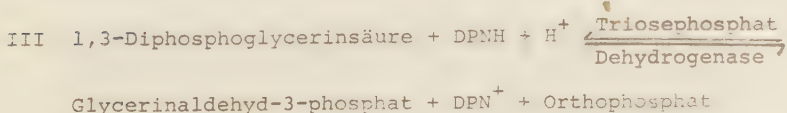
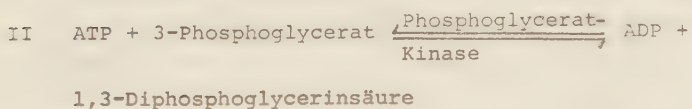


Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der Seite von Lactat und DPN. Es kann jedoch durch DPN-Überschuß, Alkalisierung und Abfangen des während der Reaktion gebildeten Pyruvats durch Hydrazin völlig auf die Seite von Pyruvat und DPNH verschoben werden. Lactat wird unter solchen Bedingungen quantitativ in Pyruvat überführt, wobei in stöchiometrischen Verhältnis DPN hydriert wird. Das entstandene DPNH dient als Meßgröße und wird spektralfotometrisch bei 366 m μ bestimmt.

Chemische (66) und enzymatische (97) Kreatinphosphatbestimmung und ATP (98) Bestimmung

Das Kreatinphosphat wurde chemisch (66) und enzymatisch (97) bestimmt. Bei der chemischen Analyse wurde zunächst (a) eine kolorimetrische Phosphatbestimmung in saurem Milieu durchgeführt, anschließend (b) bei neutraler Reaktion das Phosphat als Ca-Salz ausgefällt. Die Differenz a-b ergibt das säurelabile Phosphat. Durch eine quantitative Abtrennung des Kreatinphosphats als Calciumsalz und dessen Analyse konnte festgestellt werden, daß das säurelabile Phosphat und das Kreatinphosphat identisch sind (66).

Bei der enzymatischen Kreatinphosphatbestimmung werden die Versuche mit Perchlorsäure (6 % HClO_4 Endkonz.) ent-eiweißt, die Ansätze werden 10 Min. in ein Eisbad von 0°C gestellt und anschließend filtriert. Einem aliquoten Teil des Filtrates wird zur Perchloratfällung ein Puffer bestehend aus 1 m Triäthanolamin und 1,3 m Kaliumkarbonat zugesetzt; die Ansätze werden abermals 10 Min. in ein Eisbad von 0°C gestellt und filtriert. Ein aliquoter Teil des Filtrates (pH 7,5) dient zur enzymatischen Kreatinphosphat- und ATP-Bestimmung, die nach folgendem Prinzip durchgeführt werden:



Die Änderung der molaren Konzentration des reduzierten Coenzyms durch Übergang in den oxydierten Zustand kann spektralphotometrisch bei 340 m μ verfolgt werden. Durch Abfangen des Glycerinaldehyd-3-phosphates mit Cystein erfolgt stöchiometrischer Umsatz. Da in die beschriebene Reaktionsfolge außer Kreatinphosphat auch ATP einbezogen wird, erhält man einen Gesamtwert für energiereiches Phosphat, dessen ATP-Anteil ebenfalls durch enzymatische Analyse bestimmbar ist. Aus der Differenz der beiden Analysenresultate errechnet sich der Wert für Kreatinphosphat.

Vergleich der chemisch und enzymatisch ermittelten Kreatinphosphatwerte.

Tabelle 4 Kreatinphosphat in μ Mol/g Muskel
(chem. Best.: Mittelwerte aus je
5 Analysen; enzym. Best.: Mittel-
werte aus je 4 Analysen)

Versuchsbe- dingungen	Kreatinphosphat	
	chem. Best. μ Mol/g	enzym. Best. μ Mol/g
direkt	6,1	10,1
anaerob	3,4	0,8
aerob	19,6	21,4

Die Analysenwerte der chemischen und enzymatischen Bestimmung nach einer 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff stimmen überein. Auch nach Inkubation im Vakuum ergeben sich annähernd gleiche Werte. Daß die Direktversuche etwas schwanken, ist auf eine unterschiedliche Muskelaktivität der Tiere vor der Schlachtung zurückzuführen und auf die unterschiedliche Länge der Zeit, die von der Schlachtung bis zur Unterbrechung der Reaktionen vergeht. In dieser Zeit ist durch auftretenden Sauerstoffmangel ein Kreatinphosphatzerfall möglich.

Ergebnisse

Wie bereits berichtet, haben Lynen (31-32) und Johnson (33) 1941 fast gleichzeitig eine Theorie vorgeschlagen, welche den Pasteur-Effekt im Prinzip auf eine Konkurrenz von Atmung und Gärung um das anorganische Phosphat und das Adenosindiphosphat zurückführt. Lynen (5,34-39) hat gezeigt, daß die Orthophosphatkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit im Embden-Meyerhof-System begrenzt und eine Verminderung des Phosphatgehaltes auslösendes Moment der aeroben Glykolysehemmung ist, die den Pasteur-Effekt einleitet.

Eine weitere Ursache für die Begrenzung der Geschwindigkeit biochemischer Reaktionen ist die Änderung der Menge an aktivem Enzym. Die vorliegende Arbeit soll am Beispiel der Glykogen-Phosphorolyse zeigen, ob ein derartiger Mechanismus den Pasteur-Effekt eines morphologisch intakten Systems mitbestimmt. Meyer, Reisert und von Kuhenheim (66) wählten zum Studium des Pasteur-Effekts Muskulatur vom Stiernacken, da hier im Gegensatz zu anderen Gewebearten, keine Hemmung des Pasteur-Effekts nach einer gewissen zellulären Destruktion infolge mechanischer Aufschließung eintritt (26-28). Zur Aufschließung des Gewebes dient ein Fleischwolf mit Siebplatte von 2 mm Lochweite. Die histologischen Untersuchungen⁺⁾ zeigen Muskelfaser-Fragmente (maximale Länge 2,0 mm, minimale Länge 0,9 mm) an deren Enden Muskelfibrillen austreten. Innerhalb des Fragments aber entspricht die histologische Struktur weitgehend dem Aufbau morphologisch intakter Muskelfaser.

+) Die histologischen Untersuchungen wurden von Herrn Prof. Dr. R. Wetzstein, vom Institut für Histologie und experimentelle Biologie der Universität München durchgeführt.

Wie die Versuchsergebnisse (66) zeigen, kann die intrazelluläre Phosphatkonzentration in Abhängigkeit von der Konzentration des umgebenden Milieus so geregelt werden, daß die Orthophosphatkonzentration als begrenzender Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit im Embden-Meyerhof-System ausgeschaltet wird; die Phosphatkonzentration der intrazellulären wasserlöslichen Phase des biologischen Systems beträgt $3,5 \times 10^{-2} \text{ m}$.

Da die vollständige Oxydation der Kohlenhydrate mit denselben Phosphorylierungsreaktionen und Umsetzungen eingeleitet wird, wie die Vergärung, kann man aus dem Phosphatumsatz Aufschluß über die Lage der ersten aeroben Hemmstufe im Embden-Meyerhof-System erhalten. Die Phosphatanalysen zeigen, daß die erste aerobe Aufstauung der Substrate des Embden-Meyerhof-Systems bei hoher intrazellulärer Orthophosphatkonzentration vor den ersten Phosphorylierungsstufen erfolgt. Dies konnte durch Analyse der Gesamtkohlenhydrate bestätigt werden. Unter anaeroben Bedingungen sind nach 2 stdg. Inkubation des Systems etwa 51 % des ursprünglichen Glykogen- und Glucosegehaltes nachweisbar, aerob jedoch 97 %. Diese Aufstauung von Glykogen und Glucose läßt erkennen, daß die aerobe Hemmung des Kohlenhydratabbaues bei hoher intrazellulärer Orthophosphatkonzentration primär bei der Phosphorolyse des Glykogens und der Phosphorylierung der Glucose einsetzt. Bezüglich der Phosphorolyse des Glykogens ist dieser Befund nur denkbar, wenn man annimmt, daß die Geschwindigkeit dieser Reaktion unter den gegebenen Bedingungen durch die Menge an aktivem Enzym begrenzt wird. Eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit könnte dadurch zustande kommen, daß das entsprechende Enzym, die Phosphorylase, durch Hexosephosphate gehemmt wird, die sich intrazellulär anhäufen, weil ihr Abbau über weitere Reaktionsstufen des Embden-Meyerhof-Systems aerob teilweise blockiert ist.

Eine Enzyminaktivierung durch Hexosephosphate wurde bisher nur für Hexokinase beschrieben. Weil, Malherbe und Bone (99) Cardini (100), sowie auch Crane und Sols (101) haben beim Studium der Hexokinasen verschiedener tierischer Gewebe eine starke Hemmung des Enzyms durch Glucose-6-phosphat beobachtet. Nach Morgan und Parmeggiani (68-72) beeinflusst Glucose-6-phosphat die Aktivierung von Phosphorylase b und zwar verhindert ein Anwachsen des Glucose-6-phosphat-Spiegels die Überführung von inaktiver Phosphorylase b in ihre aktive Form.

Zur Klärung des Problems einer diesbezüglichen Inaktivierung der Phosphorylase wurde (66) unter anaeroben Bedingungen der Einfluß hoher intrazellulärer Hexosephosphatkonzentration auf die Aktivität des Enzyms untersucht. Die notwendige Konzentrationserhöhung der phosphorylierten Zucker wurde durch Blockierung ihres weiteren Abbaues über die Stufe des Triosephosphates mit Bromessigsäure erreicht. Alkylierung mit $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Bromessigsäure inaktiviert unter den gegebenen Bedingungen die Triosephosphatdehydrogenase so vollständig, daß selbst nach 2 Stdn. anaerober Inkubation noch keine Milchsäure entstanden ist. In dieser Zeit hat sich die stationäre Orthophosphatkonzentration um etwa 30 % vermindert, als Folge einer entsprechenden Zunahme des Gehaltes an phosphorylierten Zuckern, die über die inhibierte Fermentierungsstufe nicht weiter abgebaut werden konnten. Unter diesen Bedingungen werden etwa 90 % des Muskel-Glykogens phosphorolytisch gespalten. Der Vergleich mit dem entsprechenden Umsatz ohne Bromessigsäureinaktivierung des Systems, zeigt, daß Hexosephosphate, die sich intrazellulär anhäufen, da ihr weiterer Abbau blockiert ist, die Aktivität der Phosphorylase nicht vermindern. Ein derartiger Mechanismus kann somit zur Erklärung der aeroben Hemmung der Geschwindigkeit der Glykogen-Phosphorolyse eindeutig ausgeschlossen werden.

Es wurde deshalb angenommen, daß die postulierte aerobe Verminderung der Menge an aktiver Phosphorylase in engem Zusammenhang mit den Oxydationsreaktionen des Warburg-Keilin-Systems der Mitochondrien erfolgt (66). Dieser Mechanismus ist unabhängig von einem Prinzip der Regulation des Kohlenhydratabbaues, das nach Lynen (5,34-39) auf einer Konkurrenz von Atmung und Gärung um das anorganische Phosphat und das Adenosinphosphat beruht. Es handelt sich um ein zweites Regulationsprinzip, das den Pasteur-Effekt sehr wesentlich mitbestimmt.

Kopplung von Gärung und Atmung

Die vorliegenden Arbeiten wurden unternommen, um zu untersuchen, durch welchen Mechanismus aerob die Menge an aktiver Phosphorylase vermindert wird. Den Untersuchungen lag die Annahme zugrunde, daß der gesuchte Mechanismus in engem Zusammenhang mit den Oxydationsreaktionen des Warburg-Keilin-Systems steht und somit eine besondere Form der Kopplung zwischen Gärung und Atmung existiert.

Kenntnisse über die Natur einer Kopplung von Gärung und Zellatmung konnten durch koordinierende Beobachtungen des Verhaltens der Atmungsaktivität, der oxydativen Phosphorylierung und des Glykogenabbaues bei Änderung der Sauerstoffkonzentration des Milieus und bei Einsatz von 2,4-Dinitrophenol und Kaliumcyanid gewonnen werden. Wie Abb. 3 zeigt, bringt eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration des Milieus von 100 % auf 15 % keine wesentliche Änderung der Atmungsaktivität, des Glykogenabbaues und der Milchsäurebildung mit sich. Bei einer Sauerstoffspannung von 20 %, die dem Sauerstoff-Partialdruck der Luft entspricht, findet man eine Atmungsaktivität von 105 %, der Glykogenabbau beträgt 3,6 % des

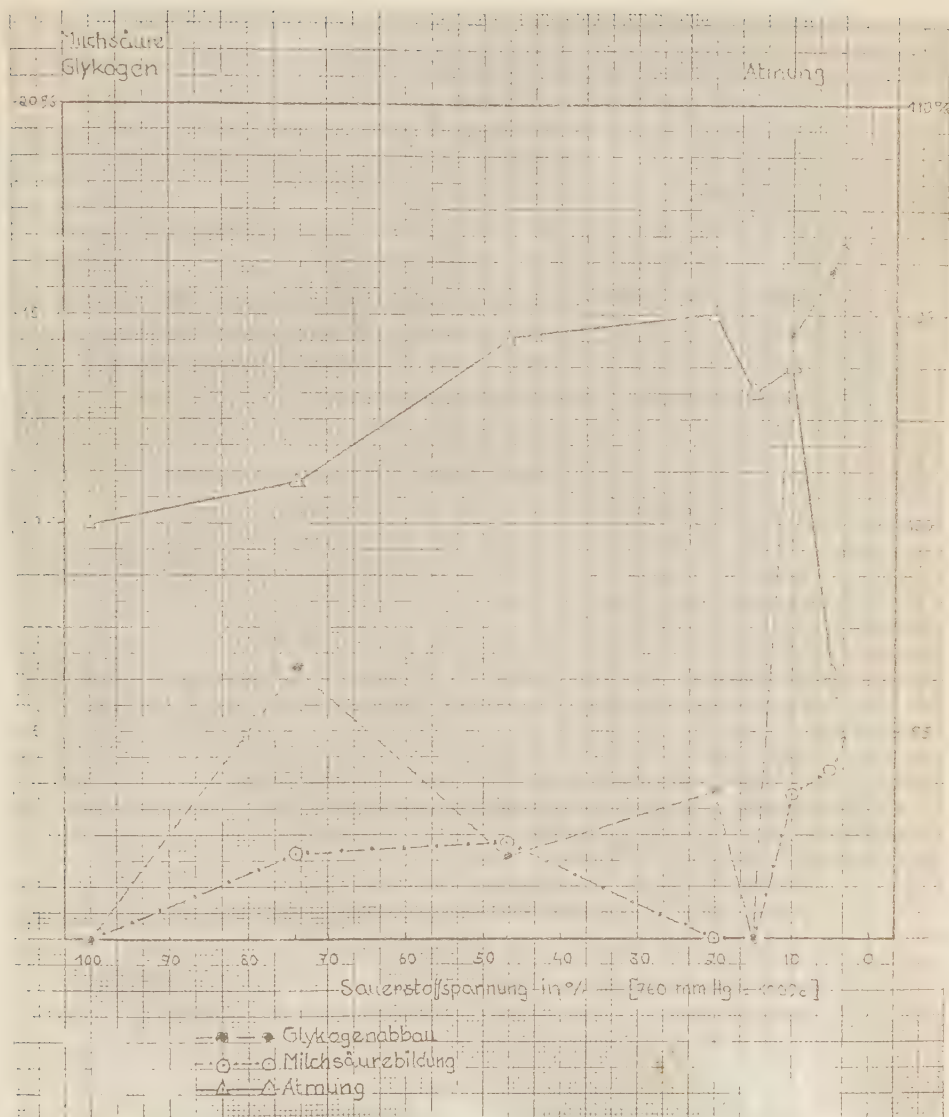


Abb. 3 Gewebeatmung, Glykogenabbau und Milchsäurebildung in Muskelfaser-Fragmenten bei verschiedenen Sauerstoffspannungen (Mittelwerte aus je 4 Analysen) (E. Meyer, Hoppe-Seyler in publice.)

Wertes der unter anaeroben Bedingungen mit 100 % angegeben wird, die Milchsäurebildung ist gehemmt. Ähnlich liegen die Werte für eine Sauerstoffspannung von 15 %, Atmungsaktivität 103 %, Glykogenabbau und Milchsäurebildung 0 %. Sinkt die Sauerstoffspannung auf 5 %, so nimmt die Atmungsaktivität deutlich ab, der Glykogenabbau steigt auf 16 % an, die Milchsäurebildung auf 4 %. Zellatmung und Hemmung des Glykogenabbaues zeigen somit bei Änderung der Konzentration des molekularen Sauerstoffs ein übereinstimmendes Verhalten: die Beschleunigung des Glykogenabbaues setzt erst bei einer Sauerstoffkonzentration ein, bei der auch die Zellatmung vermindert ist.

Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die von Laser (102) 1937 gefundenen Ergebnisse. In verschiedenen Geweben Retina (Schwein), Chorion (Ratte), Allantois (Hühnchen), Crocker-Sarkom (Maus) blieb die Atmungsaktivität bei einer Sauerstoffspannung von 5 % bis 100 % annähernd konstant, während die Glykolyse bereits bei einer Konzentration von 10 % deutlich beschleunigt war und mit Abnahme der Sauerstoffspannung auf 5 % weiter zunahm. Er zeigte, daß die Hemmung der aeroben Glykolyse bei Änderung der Sauerstoffspannung von 5 % auf 100 % zunimmt, ebenso ist eine vermehrte Aktivität der Oxydasensysteme zu verzeichnen, während die Atmungsaktivität weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Der Befund, den wir durch unsere Versuche erhalten haben, bietet keinen Hinweis, daß an der Kopplung von Atmung und Gärung, auf welcher der Pasteur-Effekt basiert, unmittelbar Oxydasen teilnehmen. Das weitgehend übereinstimmende Verhalten von Zellatmung und Glykolyse auf die Änderung eines Parameters, nämlich der Sauerstoffkonzentration des Milieus, weist daraufhin, daß Atmung und Gärung über das Enzym-System der Atmungskette gekoppelt sind.

Es bestand nun eine weitere Frage, ob das phosphorylierende oder das elektronentransportierende System der Atmungskette in diese Kopplungsreaktion eingreift. Zur Klärung dieser

Problems wurde untersucht, welchen Einfluß die Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung mit 2,4-Dinitrophenol auf die aerobe Kopplung von Gärung und Atmung ausübt.

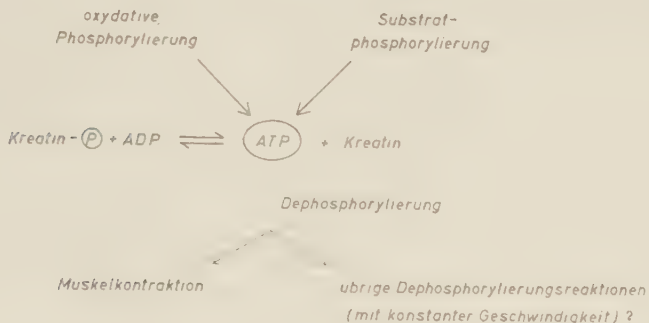


Abb. 4 Schema über konkurrierende Reaktionen beim Auf- und Abbau von Kreatinphosphat und ATP im Muskel.

Maßgebend für die Beurteilung der oxydativen Phosphorylierung waren die Konzentrationen der energiereichen Phosphate d.h. des Adenosintriphosphats und des Kreatinphosphats. Diesem analytischen Vorgehen lagen folgende Überlegungen zugrunde: Die oxydative Phosphorylierung und die Substratphosphorylierung liefern das ATP. Kreatinphosphat, das als Energiespeicher dient, überträgt sein energiereiches Phosphat auf das ADP und so entsteht ebenfalls ATP. Diese Reaktion läuft schneller ab als die glykolytischen und oxydativen Prozesse, die ja gleichfalls das entstandene ATP-Defizit wieder auffüllen können.

Beim Wechsel von Atmung zur Gärung bleibt der ATP-Spiegel nahezu konstant (Abb. 5, Tab. 5). Dieselben Beobachtungen machten Lynen und Holzer (43) bei ihren Experimenten, die mit Hefezellen durchgeführt wurden, Aisenberg und Potter (25) an einem System, das aus löslichen Zellanteilen und

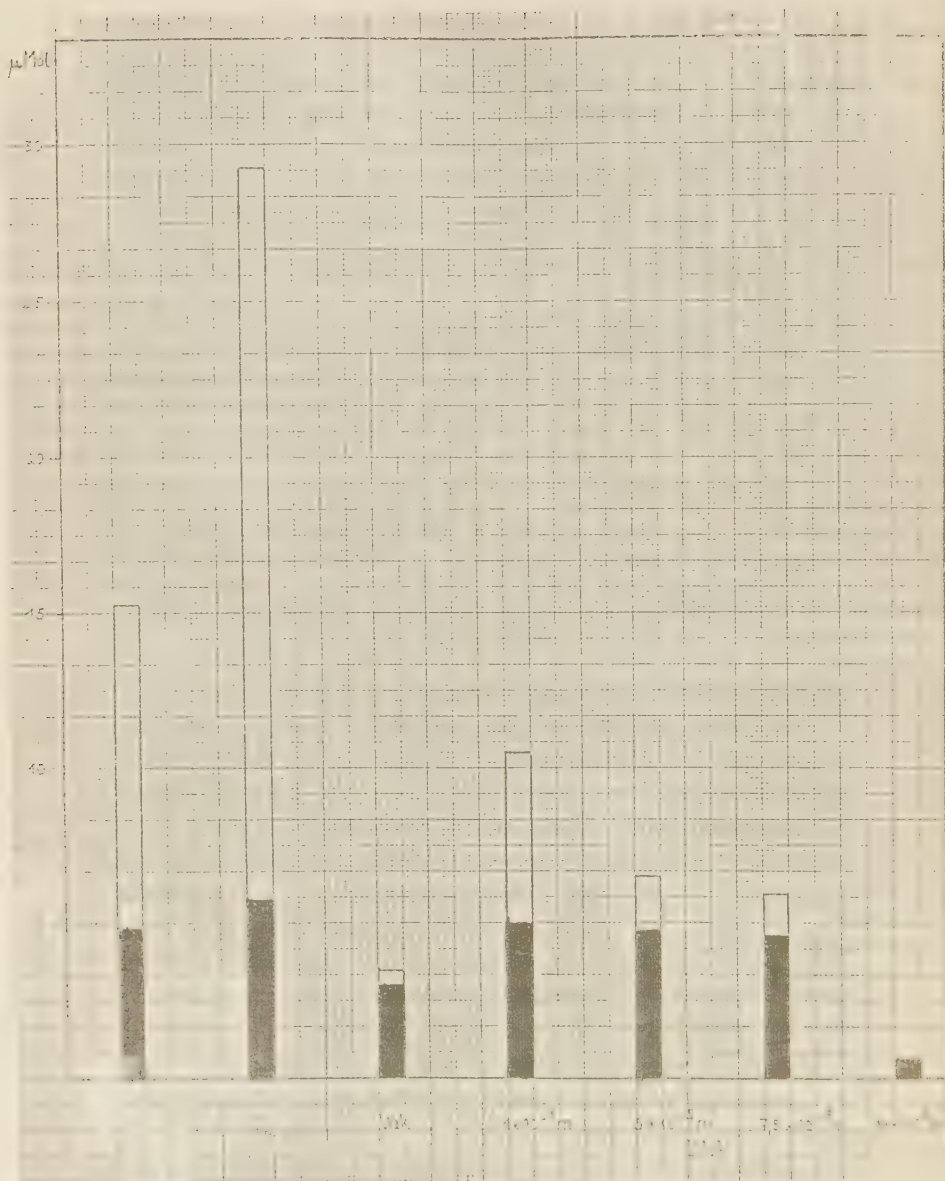


Abb. 5 Umsatz von Adenosintriphosphat und Kreatinphosphat in $\mu\text{Mol/g}$ Muskel (enzymatisch analysiert) in Muskelfaser-Fragmenten. Konzentration an ATP (schwarze Säulen) und Kreatinphosphat (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.) nach 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff bzw. in Sauerstoff und verschiedenen Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol (DNP) und im Vakuum. (Werte aus Tab. 5)

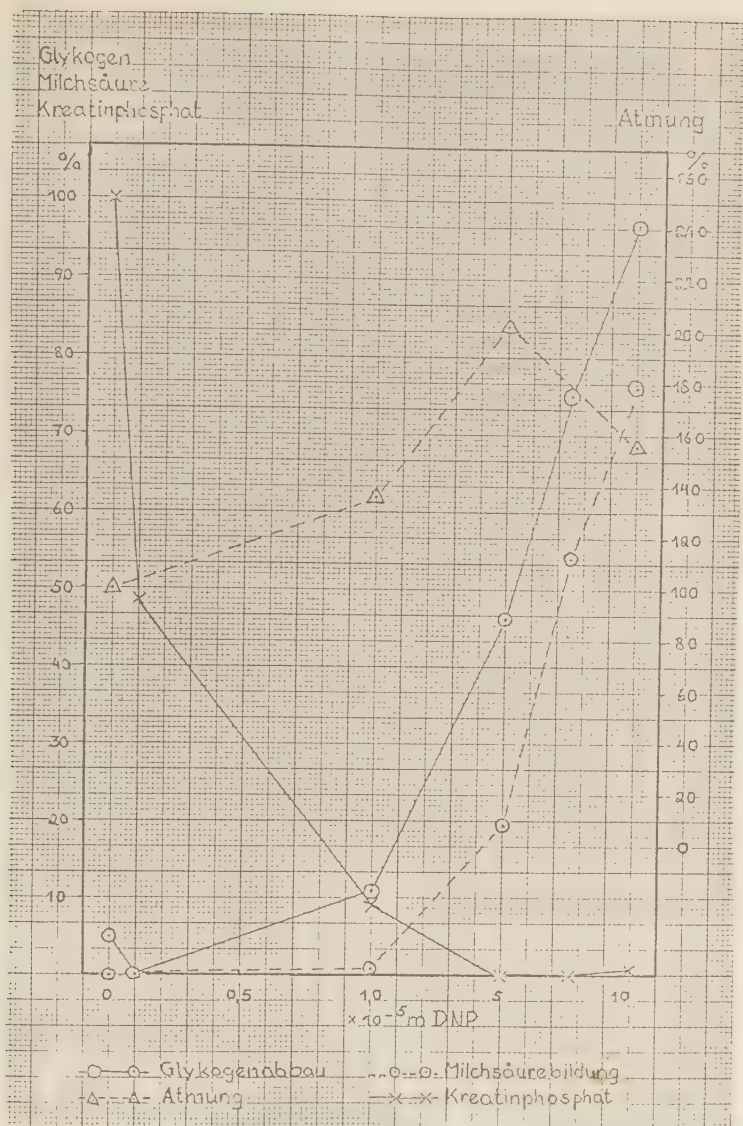


Abb. 6 Gewebeatmung, Glykogenabbau, Milchsäure- und Kreatinphosphatbildung (chem. analysiert) bei verschiedenen Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol (DNP). (E. Meyer Hoppe-Seyler in publico)

Mitochondrien zusammengestellt war; auch bestehen nach Lynen und Koenigsberger (39) keine Anhaltspunkte für eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphorylierungsvorgänge bei dem Wechsel der Gasphase. Wie Abb. 5, Tab. 5 zeigt, ändert sich bei Sauerstoffentzug nur der Kreatinphosphatspiegel. Auch die Ausschaltung der oxydativen Phosphorylierung mit 2,4-Dinitrophenol zeigt sich durch Senkung des Kreatinphosphatspiegels.

Bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-5} \text{ m}$ 2,4-Dinitrophenol (Abb. 6) ist die oxydative Phosphorylierung - gemessen an der Bildung von Kreatinphosphat - fast vollständig gehemmt, während die Atmung infolge der Entkopplung auf 136 % gesteigert ist; interessanterweise bleibt der Glykogenabbau (Abb. 6) gehemmt. Auch Lynen und Koenigsberger (39) wiesen in ihren Arbeiten mit Hefezellen darauf hin, daß bei einer Konzentration von $\text{m}/10.000$ 2,4-Dinitrophenol noch ein Einfluß der Atmung auf die Gärung zu verzeichnen ist. Erst mit zunehmender Konzentration von $\text{m}/5000$ 2,4-Dinitrophenol wird auch die Glykogen-Phosphorolyse beschleunigt. Bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-4} \text{ m}$ 2,4-Dinitrophenol erreicht der Glykogenabbau (Abb. 6) Werte, wie sie etwa bei anaeroben Versuchsbedingungen gefunden werden. Abb. 5 und Tabelle 5 zeigen die enzymatisch ermittelten Kreatinphosphat- und ATP-Werte bei verschiedenen Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol. (Es besteht eine Übereinstimmung der chemisch und enzymatisch ermittelten Daten.)

Die Entkopplung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung tritt also bei niedriger Konzentration von 2,4-Dinitrophenol ($1 \times 10^{-5} \text{ m}$) ein, als die Entkopplung von Atmung und Gärung durch $1 \times 10^{-4} \text{ m}$ 2,4-Dinitrophenol. Unter den gegebenen Bedingungen ist die Entkopplung von Atmung und Gärung keine sekundäre Folge der Entkopplung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung wie es Lynen (5,39) angibt. Unserer Meinung nach hat das 2,4-Dinitrophenol einen weiteren noch unbekannten Angriffspunkt durch den es den Glykogenabbau aktiviert.

Tabelle 5 Kreatinphosphat und ATP in $\mu\text{Mol/g}$ Muskel
(enzym. Best.) Kreatinphosphatkonzentration
aerob - anaerob = 23.0 μMol = 100 %
(Repräsentatives Beispiel von 4 Versuchen)

	2,4-Dinitro- phenol m	ATP $\mu\text{Mol/g}$	Kreatinphosphat $\mu\text{Mol/g}$	Hemmung der oxydat.Phos- phorylierung
direkt	-	4,8	10,4	-
anaerob	-	3,0	0,4	-
	-	5,8	23,4	0 %
	1×10^{-4}	0,6	0,0	100 %
aerob	$7,5 \times 10^{-5}$	4,6	1,3	90,3 %
	5×10^{-5}	4,7	1,8	88,0 %
	1×10^{-5}	4,9	5,6	72,5 %

Hieraus ergibt sich zwingend, daß Konzentrationsverschiebungen im Adenylsäure-System, die bei Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung mit $1 \times 10^{-5} \text{ m}$ 2,4-Dinitrophenol ebenso in Erscheinung treten wie bei Entzug von Sauerstoff und unter den gegebenen Bedingungen weder durch Änderung der Massenverhältnisse noch durch Änderung der Effektoren (Parmeggiani 69-72) den Glykogenabbau wirksam beeinflussen.

Dieser Befund läßt erkennen, daß die unter diesen Bedingungen festgestellte Kopplung von aerober Glykolyse + Atmung sich über das elektronentransportierende und nicht das phosphorylierende System der Atmungskette vollzieht.

Eine Blockierung der Atmungskette auf der Stufe der Cytochrom-Oxydase mit $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Kaliumcyanid bestätigte die Richtigkeit dieser Annahme. Kaliumcyanid in einer Konzentration von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ hemmt die Atmungsaktivität zu 70 %; $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ KCN zu 85 % (Abb. 7). Bei weiterer Steigerung der KCN-Konzentration findet man noch eine geringe Restatmung, die durch Stoffwechselvorgänge der Oxydasen bedingt ist. Abb. 8 zeigt den Verlauf der Atmung bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ KCN im Vergleich zum Kontrollversuch während 2 Stdn.. Der

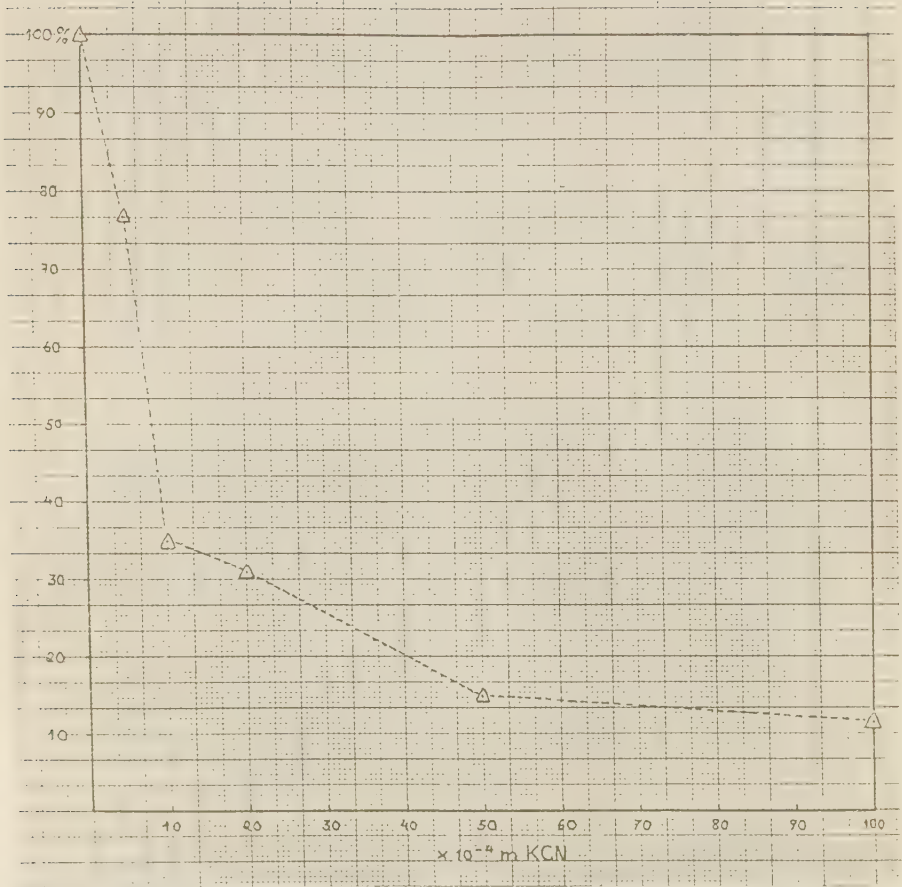


Abb. Gewebeatmung von Muskelfaser-Fragmenten nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von Kaliumcyanid (KCN).
 Kontrollversuch: $18 \mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/ g Muskel = 100 % für die Konzentrationen von $5 \times 10^{-4} \text{ m}$, $1 \times 10^{-3} \text{ m}$, $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ KCN; Kontrollversuch: $15,4 \mu\text{Mol O}_2/\text{g Muskel}$ = 100 % für die Konzentrationen von $5 \times 10^{-3} \text{ m}$, $1 \times 10^{-2} \text{ m}$ KCN (Mittelwerte aus je 4 Experimenten)

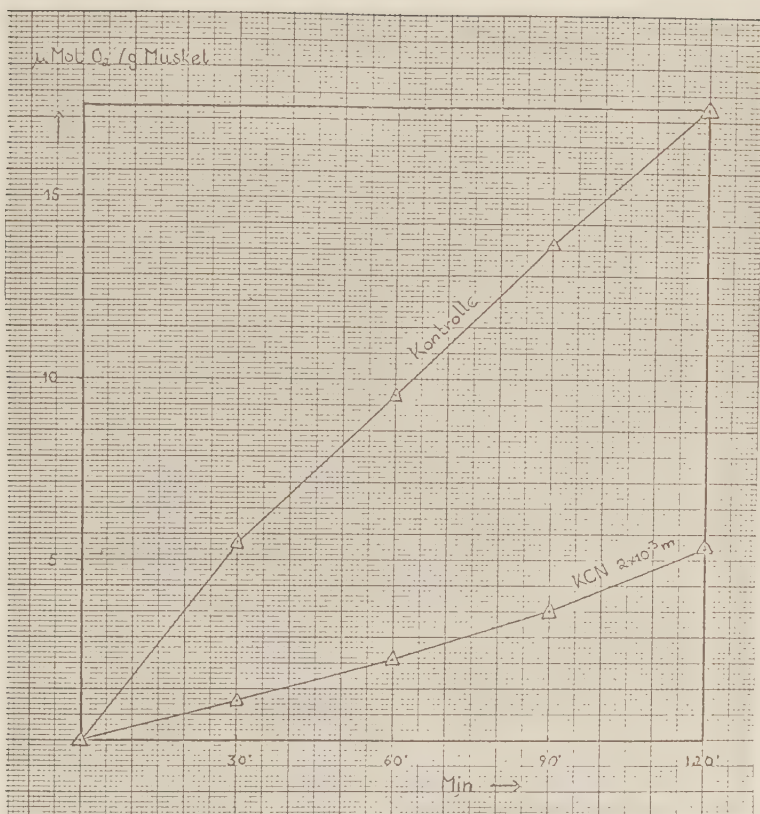


Abb. 8 Gewebeatmung in Muskelfaser-Fragmenten bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Kaliumcyanid.

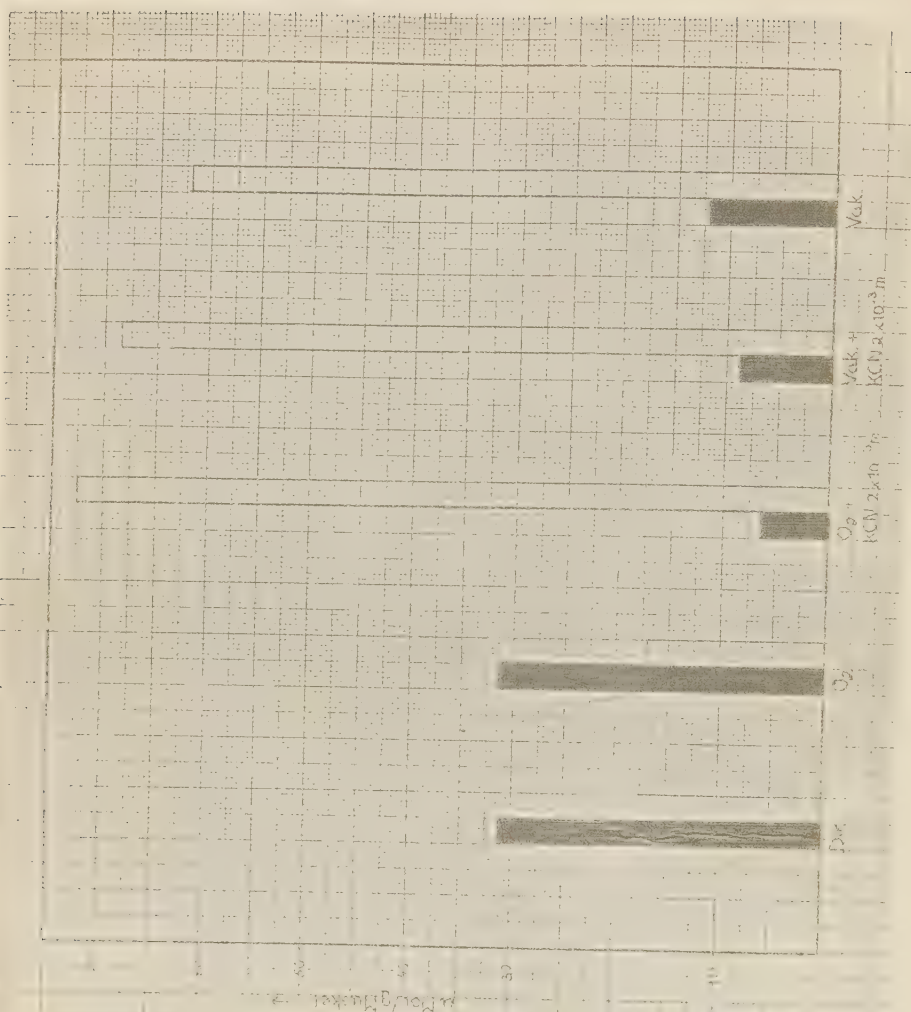


Abb. 9 Glykogen- und Milchsäurekonzentration in Muskelfaser-Fragmenten unter Inaktivierung der Cytochrom-Oxydase mit Kaliumcyanid. (Mittelwerte aus je 4 Analysen)
Glykogen- (schwarze Säulen) und Milchsäurekonzentration; (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.), nach 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff (O₂) bzw. in O₂ und 2 x 10⁻³ m KCN und im Vakuum (Vak) bzw. im Vak und 2 x 10⁻³ m KCN.

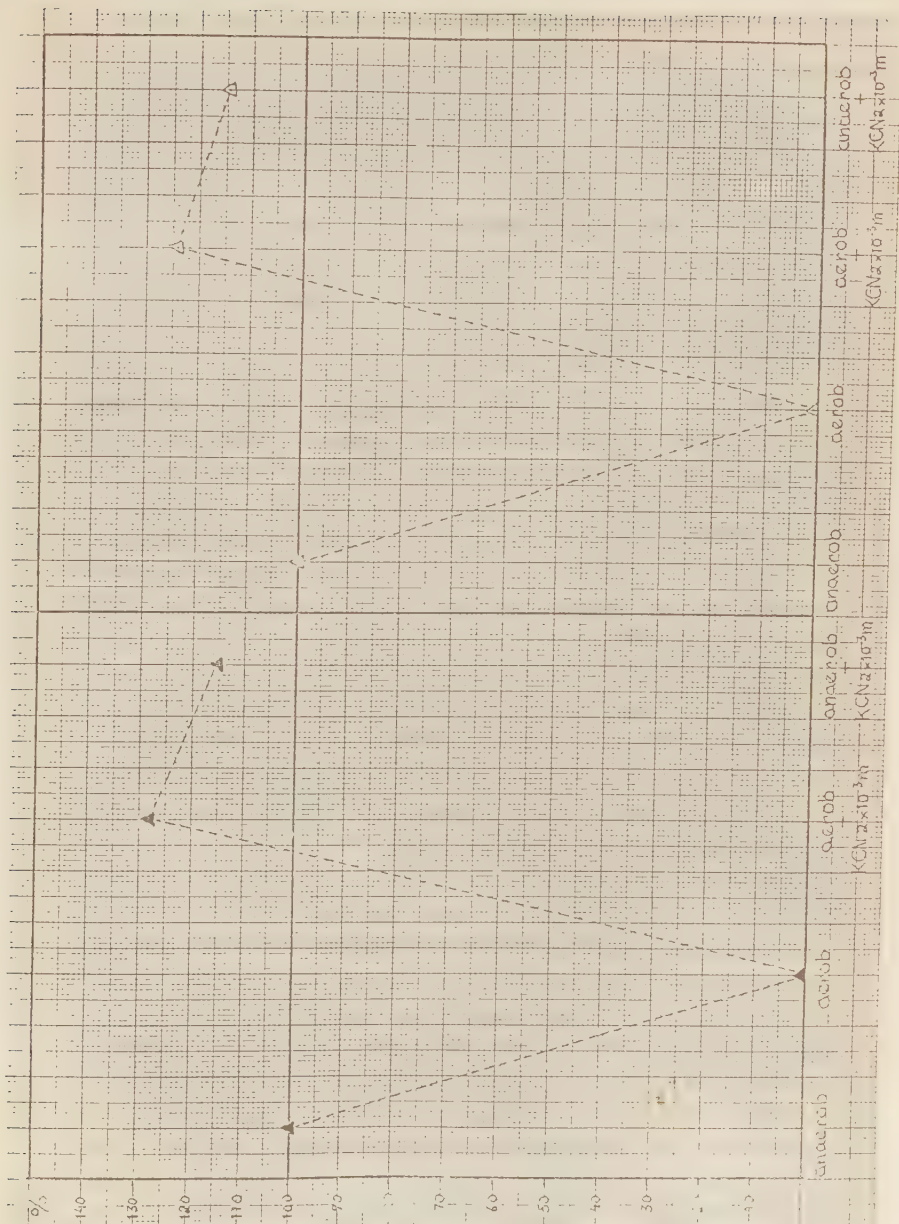


Abb. 10 Glykogenabbau ▲---▲ und Milchsäurebildung ▽---▽ 100 % = die Differenz der Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vakuum minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 9 dargestellt.

Glykogenabbau steigt in dieser Zeit bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ KCN aerob auf 127 %, die Milchsäurebildung auf 124 %, der unter anaeroben Bedingungen mit 100 % festgelegten Werte (Abb. 9 und 10). Die aerob erhöhten Glykolysewerte bei Vergiftung mit KCN kommen wahrscheinlich durch die sofortige Unterbrechung des elektronentransportierenden Systems zustande, während im Vakuum (anaerober Versuch) für kurze Zeit durch den an Myoglobin gebundenen Sauerstoffvorrat noch eine gewisse Atmung möglich ist.

Aus den bisherigen Ergebnissen kann man ersenen, daß über das elektronentransportierende System der Atmungsketten die Kopplung von Atmung und aerober Glykolyse verläuft, auf der offensichtlich der Pasteur-Effekt beruht, und in die eine Reihe von Redoxsysteme einbezogen sind. Der Mechanismus, der zur aeroben Verminderung an aktivem Enzym im Bereich des Phosphorylasesystems führt, könnte somit auf eine Oxydoreduktion zurückzuführen sein.

Der Mechanismus der aeroben Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse aus den bisherigen Untersuchungen ging hervor, daß die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse unter den gegebenen Bedingungen offensichtlich auf einer Verminderung der Menge an aktiver Phosphorylase beruht. Es ergab sich weiterhin die Annahme, daß die diesbezügliche Änderung der Phosphorylaseaktivität auf einer Oxydoreduktion beruht, in die eine Reihe von Redoxsysteme einschließlich jener der Atmungskette einbezogen sind. Die weiteren Bemühungen waren nun darauf gerichtet, die Existenz einer derartigen Oxydoreduktion nachzuweisen und ihren Mechanismus kennen zu lernen. Zu diesem Zweck wurde untersucht wie sich eine spezielle Verschiebung des Redoxpotentials zur negativen Seite aerob auf die Geschwindigkeit der Glykogen-Phosphorolyse auswirkt. In den von E. Meyer (Hoppe-Seyler in publico) durchgeführten Versuchen wurden Cystein, Glutathion und reduziertes Diphosphopyridinnucleosid

eingesetzt. Interessanterweise beeinflusste von den angewandten Reduktionsmitteln nur DPNH die Geschwindigkeit des aeroben Glykogenabbaues. Setzt man $2 \times 10^{-3} \text{ m DPNH}$ zu, so wird die aerobe Glykogen-Phosphorolyse beschleunigt. Aerob (Abb. 11) beträgt der Glykogenabbau 1,5 % des Wertes, der unter anaeroben Bedingungen mit 100 % angegeben wird; der Glykogenabbau steigt jedoch aerob etwa auf 20 %, wenn man $2 \times 10^{-3} \text{ m DPNH}$ zugibt. Analog verläuft die Milchsäurebildung: aerob 1 % bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m DPNH}$, beträgt sie aerob ca. 10 %.

Oxydiertes Pyridinnucleotid (DPN) in einer Konzentration von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ verändert aerob die Reaktionsabläufe der Glykogen-Phosphorolyse und Milchsäurebildung nicht. Offensichtlich ist durch einen Reduktionsvorgang der durch reduziertes Diphosphopyridinnucleotid gesteuert wird, eine so weitgehende Steigerung der Phosphorylaseaktivität eingetreten, daß daraus eine Beschleunigung des aeroben Glykogenabbaues resultierte. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch anaerob die große Geschwindigkeit der Glykogen-Phosphorolyse durch Reduktionsvorgänge am Phosphorylasesystem hervorgerufen wird, während aerob der Glykogenabbau durch oxydative Verminderung der Phosphorylaseaktivität gehemmt ist. Das molare Verhältnis der Redoxpartner DPN/DPNH greift in die Oxydoreduktionsvorgänge am Phosphorylasesystem ein und es bestimmt, ob das Enzymsystem entweder durch Oxydation inaktiviert oder durch Reduktion aktiviert wird.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist kein Anhaltspunkt gegeben, daß die Beschleunigung der aeroben Glykogen-Phosphorolyse durch Zusatz von DPNH auf andere Weise, nämlich durch Verschiebung des Fließgleichgewichts infolge vermehrter Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure zustande gekommen ist. Wäre dies der Fall, so wäre bereits durch Zusatz von DPN eine Verschiebung des Fließgleichgewichts infolge vermehrter Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure zu erwarten.

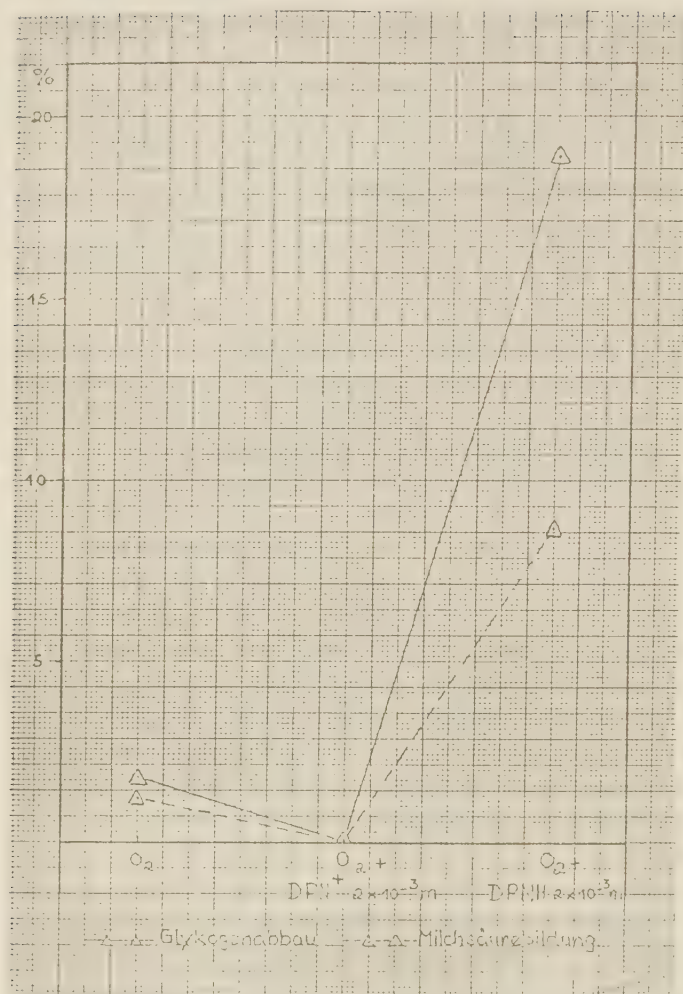


Abb. 11 Einfluß oxydierter ($2 \times 10^{-3} m DPN^+$) und reduzierter ($2 \times 10^{-3} m DPNH$) Pyridinnucleotide auf die aerobe Glykogen-Phosphorolyse und Milchsäurebildung in Muskelfaser-Fragmenten (Mittelwerte aus je 6 Analysen) (E. Meyer Hoppe-Seyler in publice)

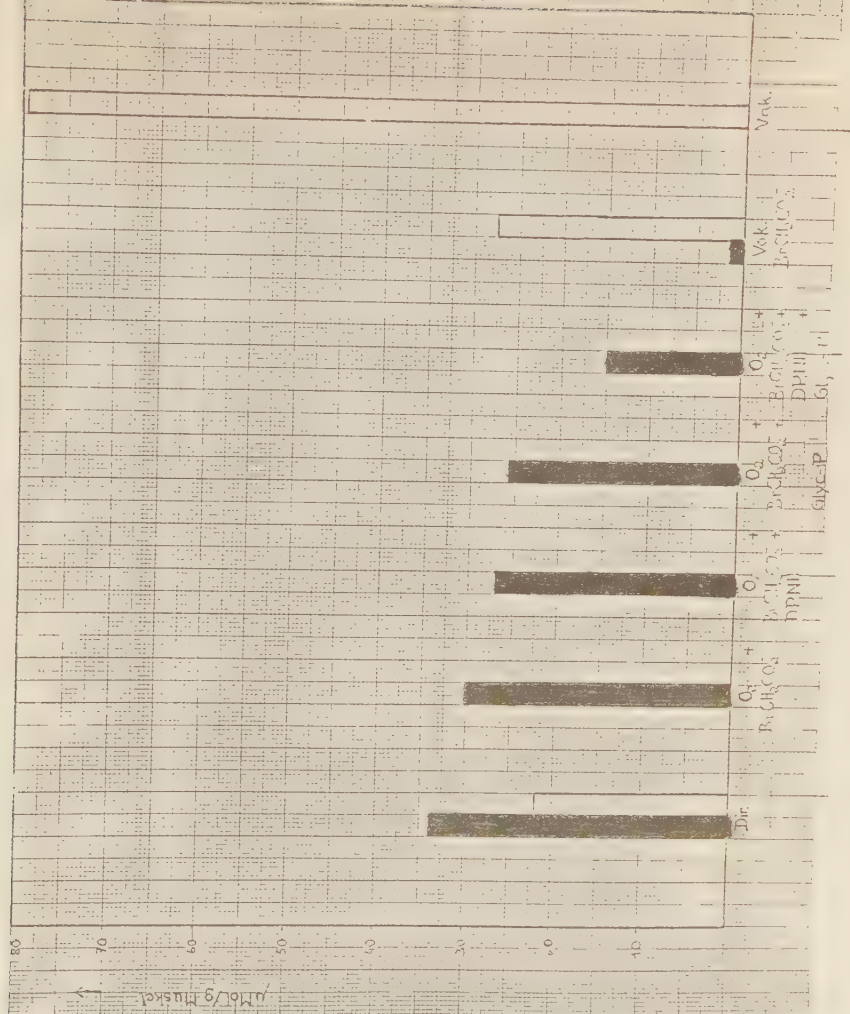


Abb. 12 Glykogen- und Milchsäurekonzentration in Muskelfaser-Fragmenten unter Inaktivierung der Triosephosphatdehydrogenase mit bromessigsäurem Natrium ($\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$) und Zusatz von reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) und Glykogenphosphat (Glyc.-P) (Mittelwerte aus je 4 Analysen). Glykogen- (schwarze Säulen) und Milchsäurekonzentration (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.) nach 2 stdg. Inkubation im Vakuum (Vak.); im Vak. und $5 \times 10^{-4}\text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$; in Sauerstoff (O_2) und $5 \times 10^{-4}\text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$; in O_2 , $5 \times 10^{-4}\text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$ und $2 \times 10^{-3}\text{m}$ DPNH; in O_2 , $5 \times 10^{-4}\text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$ und $1 \times 10^{-1}\text{m}$ Glyc.-P; in O_2 , $5 \times 10^{-4}\text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$, $2 \times 10^{-3}\text{m}$ DPNH und $1 \times 10^{-1}\text{m}$ Glyc.-P.

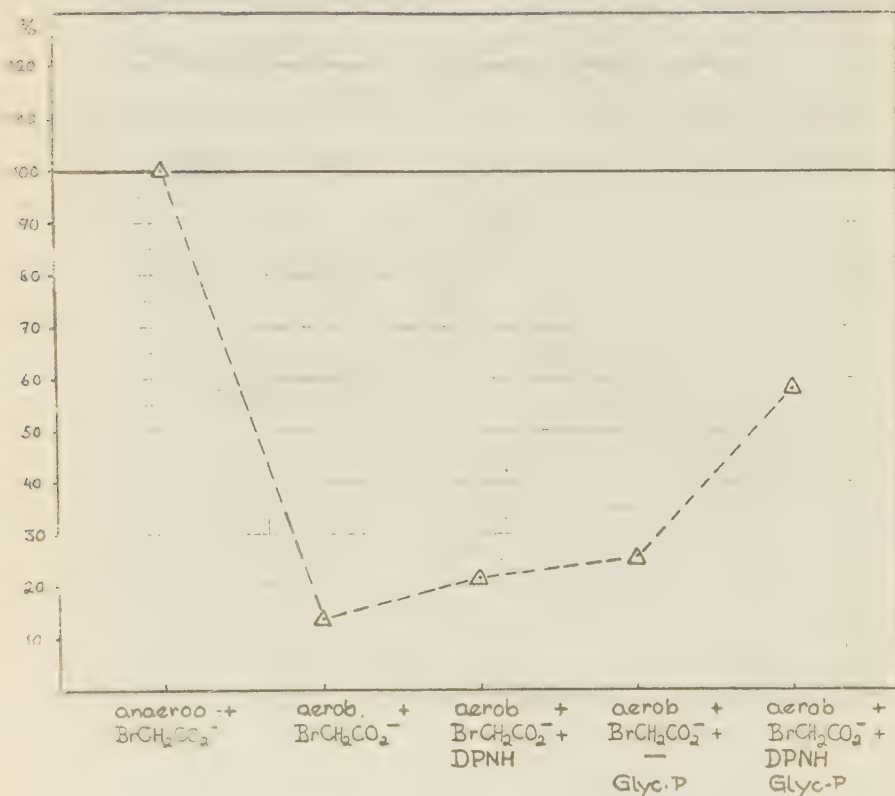


Abb 13 Glykogenabbau: 100 % = die Differenz der Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vakuum bei Zusatz von $5 \times 10^{-4} \text{m}$ $\text{BrCH}_2\text{CO}_2^-$ minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 12 dargestellt.

aldehyd eingetreten. Das Experiment hat jedoch unter diesen Bedingungen keine Beschleunigung der Glykogenphosphorolyse gezeigt (Abb. 11). Einen weiteren Beweis bietet ein Versuch, der zeigen sollte, ob DPNH auch dann die aerobe Glykogen-Phosphorolyse beschleunigt, wenn die Glykolyse auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung durch Bromessigsäure blockiert wurde. Alkylierung mit $5 \times 10^{-4} \text{ m}$ Bromessigsäure inaktiviert die Triosephosphatdehydrogenase so vollständig, daß nach 2 Std. anaerober Inkubation nur etwa $5 \mu\text{Mol/g}$ Muskel Milchsäure entstanden sind (Abb. 12). Unter dem Einfluß von $5 \times 10^{-4} \text{ m}$ Bromessigsäure ist eine Atmungsaktivität von 133 % (Tab. 6) gegenüber dem Kontrollversuch zu verzeichnen; höhere Konzentrationen von Bromessigsäure hemmen die Atmung.

Tabelle 6 Gewebeatmung bei Zusatz von verschiedenen Konzentrationen von Bromessigsäure nach 2 stündiger Inkubation (Mittelwerte aus je 4 Experimente).

	Kontroll- versuch	Bromessigsäure		
		$5 \times 10^{-4} \text{ m}$	$1 \times 10^{-2} \text{ m}$	$2 \times 10^{-2} \text{ m}$
$\mu\text{Mol O}_2/\text{g Muskel}$	16,9	22,5	9,2	6,8
Atmungsaktivität in %	100 %	133 %	55 %	40 %

Wie Abb. 13 zeigt, beträgt der aerobe Glykogenabbau bei 10^{-4} m Bromessigsäure 14 % des anaeroben Vergleichswertes, $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ DPNH vermag diese Quote zusätzlich um 8 % auf 22 % anzuheben. Auch hier liegt, wie vorher beschrieben, eine Steigerung der aeroben Glykogen-Phos-

phorolyse durch DPNH vor. Allerdings ist unter diesen Umständen die Wirkung von DPNH etwa um die Hälfte geringer (Abb. 11); dieses Phänomen läßt sich erklären, wenn man von folgender Überlegung ausgeht:

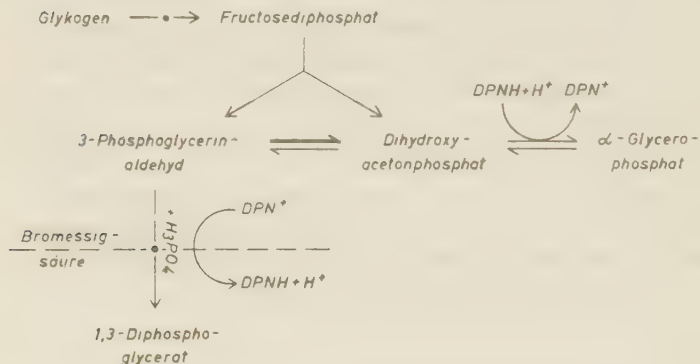


Abb. 14 Teilschema der Glykolyse nach dem Embden-Meyerhof-System.

Wird der Reaktionsablauf im Embden-Meyerhof-System auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung durch Bromessigsäure gehemmt, ist eine Verschiebung des Fließgleichgewichts in Richtung der Bildung von Dihydroxyacetonphosphat die notwendige Folge. Durch Erhöhung der Konzentration des Dihydroxyacetonphosphats kann im cytoplasmatischen Raum vermehrt DPNH oxidiert und der mobilisierte Wasserstoff über den sogenannten Glycerophosphatzyklus in die mitochondriale Atmungskette einbezogen werden. Über eine Konkurrenzreaktion dieser Art würde somit zugesetztes DPNH dem Reaktionsort der Phosphorylaseaktivierung entzogen und deshalb eine geringere Beschleunigung der aeroben Glykogen-Phosphorolyse eintreten.

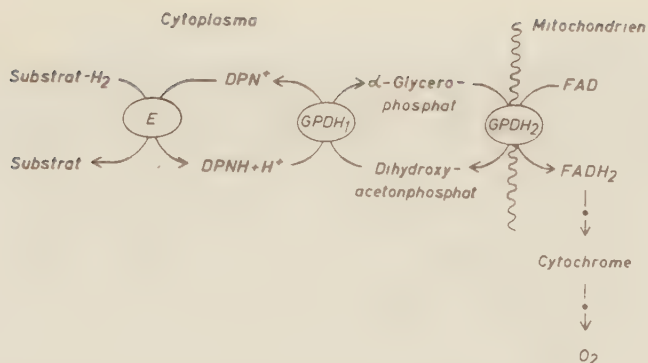


Abb. 15 Schematische Darstellung des Glycerophosphatzyklus in Anlehnung an Bücher (103)
 GPDH₁ = Baranowski-Enzym
 GPDH₂ = Meyerhof-Green-Enzym

Für den Glycerophosphatzyklus sind nach Bücher (103) zwei Enzyme von Bedeutung: das Baranowski-Enzym und das Meyerhof-Green-Enzym. Durch das Baranowski-Enzym wird im Cytoplasma Dihydroxyacetonphosphat zu α-Glycerophosphat reduziert, wobei der notwendige Wasserstoff von reduziertem Diphosphopyridinnucleotid bezogen wird. In den Mitochondrien wird Glycerophosphat durch das Meyerhof-Green-Enzym oxydiert, das den Wasserstoff an die Flavinenzyme abgibt und Dihydroxyacetonphosphat gelangt wieder ins Cytoplasma. Auf diese Weise kommt ein Reaktionszyklus zustande, der Wasserstoff aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien transportiert und der Atmungskette zuführt.

Die Existenz der postulierten Konkurrenzreaktion, durch die DPNH dem Reaktionsort der Phosphorylaseaktivierung entzogen wird, wurde durch Blockierung des Wasserstofftransports mit Amytal nachweisbar.

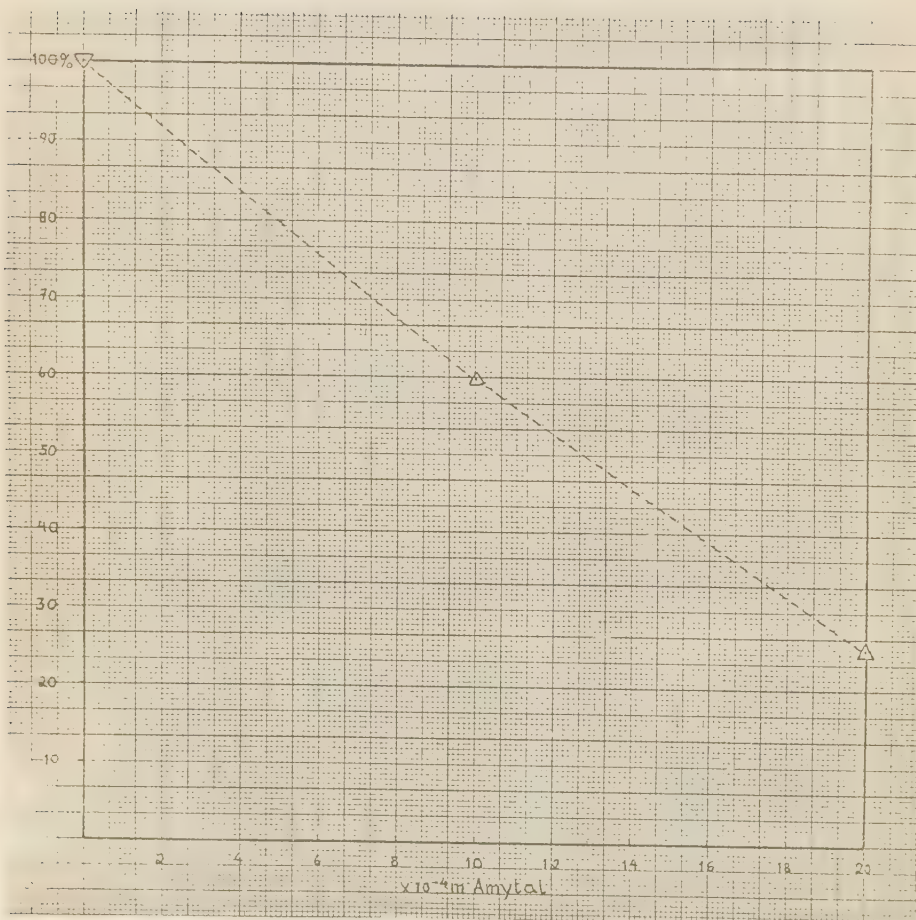


Abb. 16 Gewebeatmung in Muskelfaser-Fragmenten nach 2 stdg. Inkubation unter versch. Konz. von Amytal.
Kontrollversuch: $17,7 \mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/ g Muskel = 100 % (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

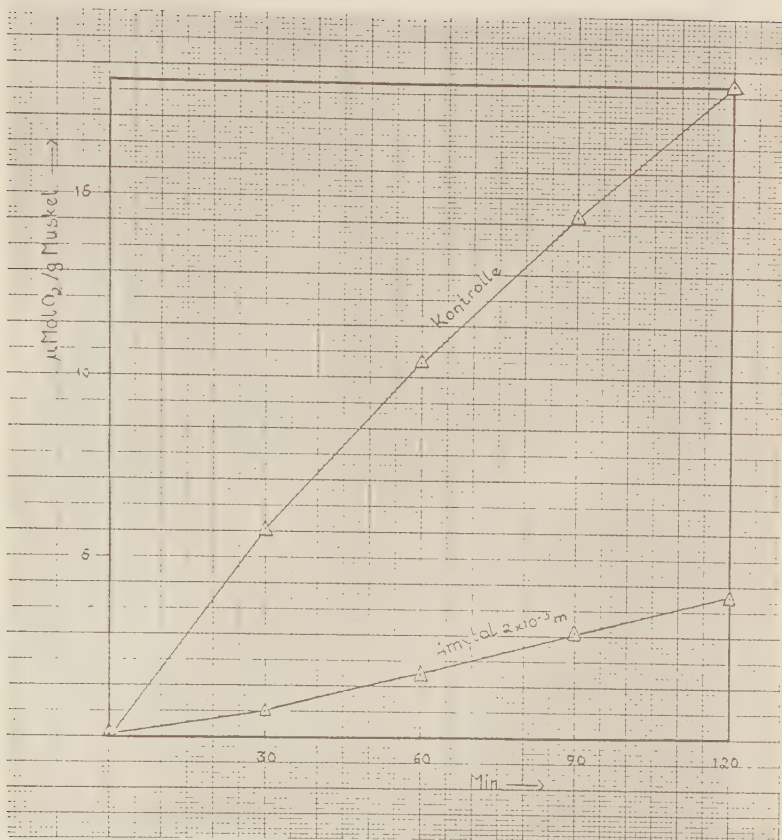


Abb. 17 Gewebeatmung in Muskelfaser-Fragmenten bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal.

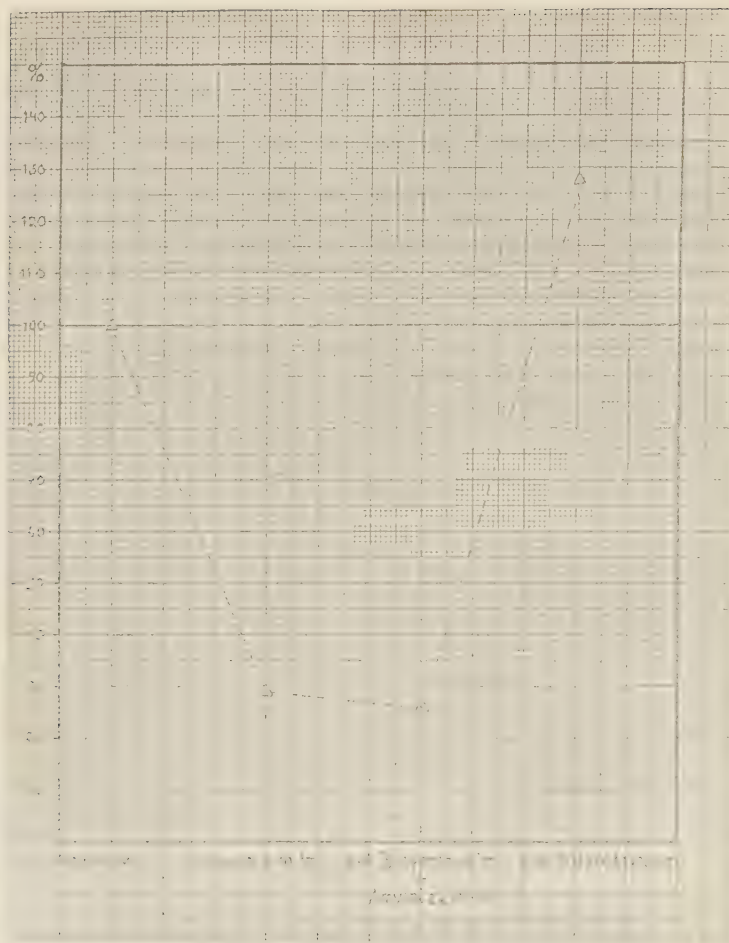


Abb. 18 Gewebeatmung der Muskelfaser-Fragmente nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ β -Hydroxybutyrat und $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ β -Hydroxybutyrat. Kontrollversuch: $15,8 \mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/ g Muskel $\times 100 \text{ s}$ (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

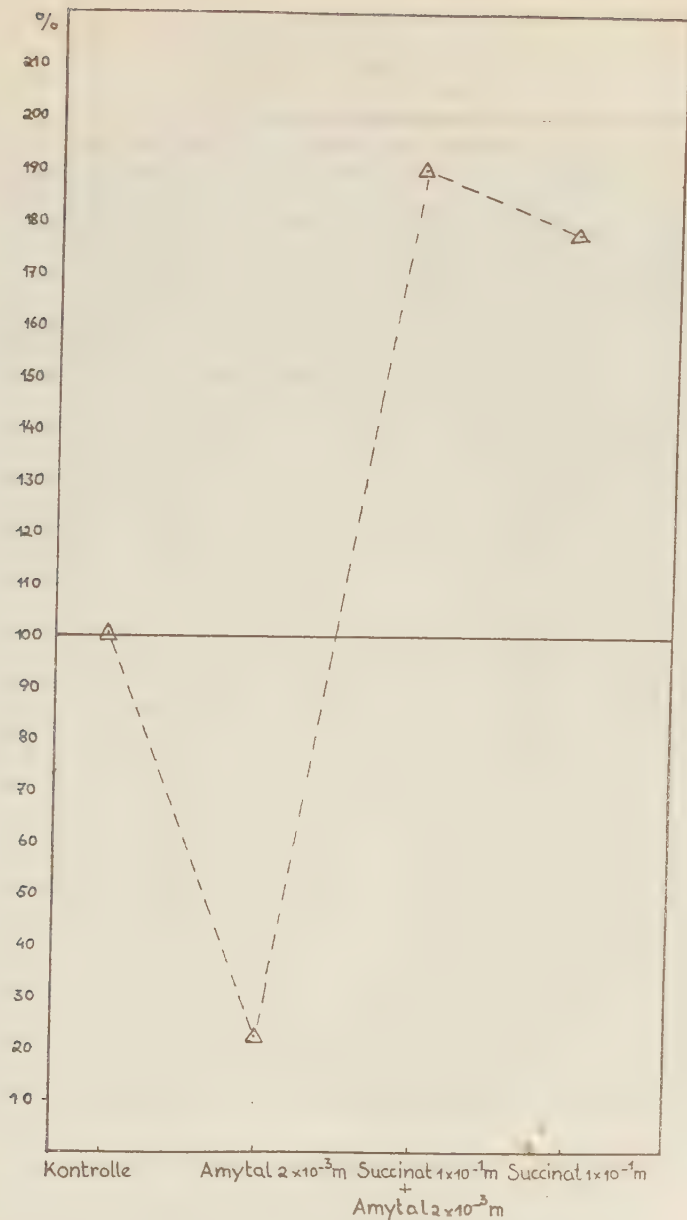
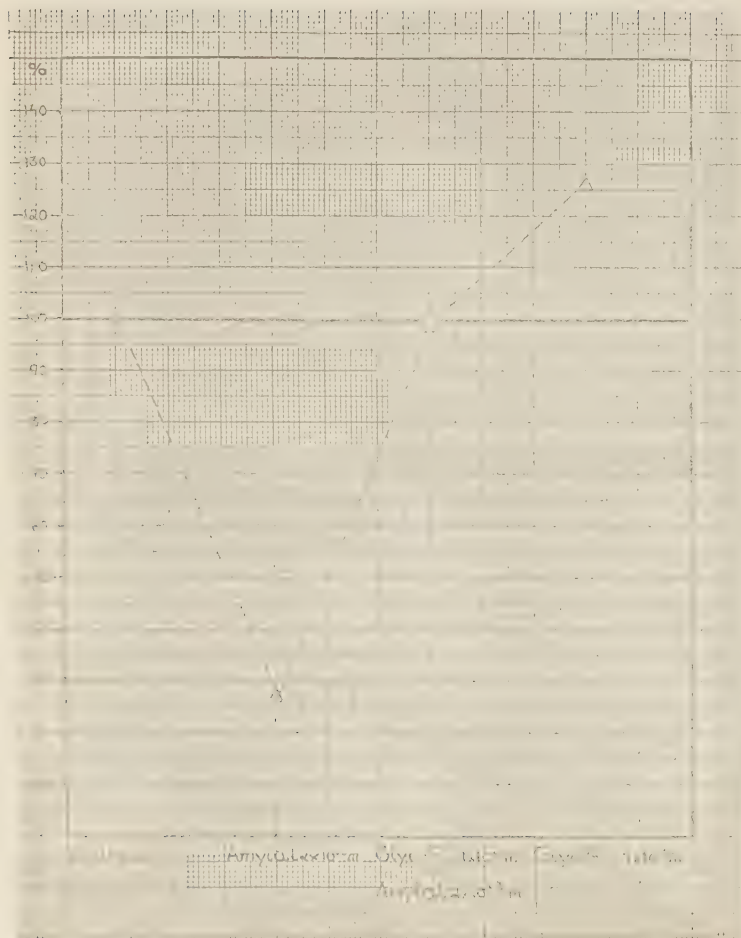


Abb. 19 Gewebeatmung von Muskelfaser-Fragmenten nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ Succinat und $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ Succinat.
 Kontrollversuch: $19,2 \mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/g Muskel = 100 % (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).



Ab: 20 Gewebeatmung von Muskelfaser-Fragmenten nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ α -Glycerophosphat und $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal; $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ α -Glycerophosphat. Kontrollversuch: $16,0 \text{ } \mu\text{Mol O}_2 \text{ Verbrauch/g Muskel} = 100 \%$ (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

Amytal hemmt den Wasserstofftransport in der Atmungskette, über den Angriffspunkt des Inhibitors bestehen verschiedene Auffassungen. Nach L. Ernster und B. Chance (104-107) blockiert Amytal den Wasserstofftransport von den Pyridinnucleotiden zu den Flavinenzymen, in anderen Arbeiten (108) wird der Angriffspunkt für Amytal zwischen den Flavinenzymen und Cytochrom b lokalisiert.

Amytal hemmt in einer Konzentration von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ die Atmungsaktivität in Muskelfaser-Fragmenten zu 73 % (Abb. 16). Abb. 17 zeigt den Verlauf der Zellatmung bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal im Vergleich zum Kontrollversuch während 2 Std.; unter diesen Bedingungen ist der Wasserstofftransport von den Pyridinnucleotiden zu den Flavinenzymen in der Atmungskette - gemessen an der Oxydation von β -Hydroxybutyrat - vollständig unterbunden (Abb. 18). Dagegen verläuft der Wasserstofftransport über die Succinodehydrogenase zu 108 % (Abb. 19, Tab. 7) und über die Glycerophosphatdehydrogenase = Meyerhof-Green-Enzym zu 72 % (Abb. 20, Tab. 7). Unter Einsatz von Amytal kann man somit die über den Glycerophosphatzzyklus verlaufende Atmungsaktivität erfassen.

Abb. 21 zeigt den Einfluß von DPNH auf die Gewebeatmung in Muskelfaser-Fragmenten bei Vergiftung des Systems mit Amytal und Bromessigsäure. Der Wasserstofftransport bei Zusatz von DPNH über den Glycerophosphatzzyklus bei Blockierung mit Amytal nimmt um 16 % zu, wenn Bromessigsäure (Abb. 21) zugegen ist. Ursache ist unter den gegebenen Bedingungen eine erhöhte Konzentration an Dihydroxyacetophosphat als Folge einer Umlenkung der Glykolyse auf der Stufe des Glycerinaldehydphosphats, dessen Dehydrierung durch Bromessigsäure gehemmt ist.

Will man die über den Glycerophosphatzzyklus verlaufende DPNH Oxydation ausschalten, so kann man dies durch Erhöhung der Konzentration an Glycerophosphat erreichen, d.h. über eine Einstellung des Gleichgewichts auf der

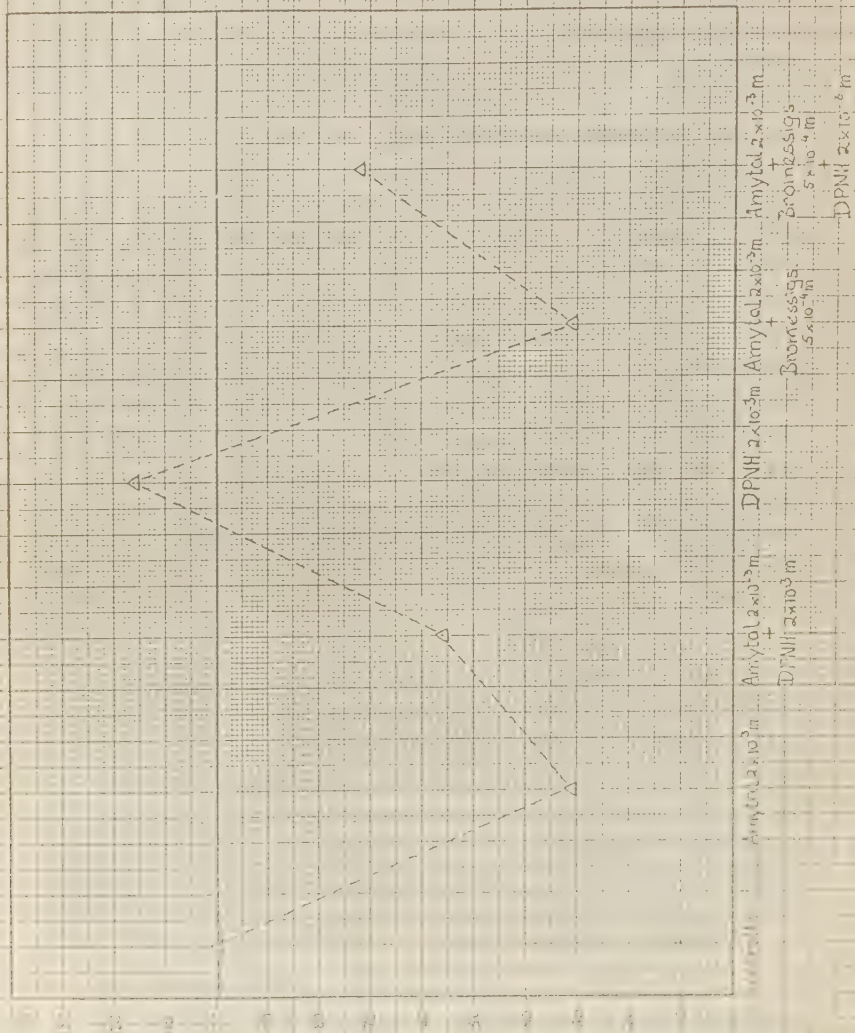


Abb. 21 Gewebeatmung in Muskelfaser-Fragmenten nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von $2 \times 10^{-3}m$ Amytal; $2 \times 10^{-3}m$ DPNH und $2 \times 10^{-3}m$ Amytal; $2 \times 10^{-3}m$ DPNH; $2 \times 10^{-3}m$ Amytal und $5 \times 10^{-4}m$ $BrCH_2CO_2$; $2 \times 10^{-3}m$ Amytal, $5 \times 10^{-4}m$ $BrCH_2CO_2$ und $2 \times 10^{-3}m$ DPNH.
Kontrollversuch: $16,3 \mu Mol O_2$ Verbrauch/g Muskel = 100 %. (Mittelwerte aus je 4 Experimenten.)

Tabelle 7 Atmungsaktivität von Muskelfaser-Fragmenten
in $\mu\text{Mol O}_2/\text{g}$ Muskel nach 2 Stdn. Inkubation
bei 22°C (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

I		II		III		IV	
mit Substrat	$\mu\text{Mol O}_2$	mit Substrat u. Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	$\mu\text{Mol O}_2$	ohne Substrat	$\mu\text{Mol O}_2$	I-III= 100%	II-III= X%
Butyrat $1 \times 10^{-1}\text{m}$	20,1	Butyrat $1 \times 10^{-1}\text{m}$	4,1	Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	4,6	100%	-3,0%
Succinat $1 \times 10^{-1}\text{m}$	34,0	Succinat $1 \times 10^{-1}\text{m}$	36,4	Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	4,3	100%	108%
DPNH $2 \times 10^{-3}\text{m}$	18,9	DPNH $2 \times 10^{-3}\text{m}$	9,2	Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	5,1	100%	30%
DPNH $2 \times 10^{-3}\text{m}$	18,9	DPNH $2 \times 10^{-3}\text{m} +$ Bromessigs. $5 \times 10^{-4}\text{m}$	11,7	Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	5,1	100%	48%
Glyc-P- $1 \times 10^{-1}\text{m}$	20,2	Glyc-P- $1 \times 10^{-1}\text{m}$	15,8	Amytal $2 \times 10^{-3}\text{m}$	4,3	100%	72%

Stufe der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu α -Glycerophosphat.

$$K = \frac{\alpha\text{-Glycerophosphat} \times \text{DPN}^+}{\text{Dihydroxyacetonphosphat} \times \text{DPNH} + \text{H}^+}$$

$K = 1,4 \times 10^{-4}$ bei 22°C und pH 7,0.

Setzt man aerob dem mit Bromessigsäure vergifteten System $2 \times 10^{-3}\text{m}$ DPNH zu, so beträgt der Glykogenabbau 22 % (Abb. 12+13). Wird nun die rasche Oxydation von DPNH verhindert durch Verschiebung des Gleichgewichts im Glycerophosphatzzyklus durch Zusatz von $1 \times 10^{-1}\text{m}$ Glycerophosphat, so ist eine bedeutende Glykogen-Phosphorolyse die Folge, der Glykogenabbau steigt auf 60 %. $1 \times 10^{-1}\text{m}$ α -Glycero-

phosphat allein beschleunigt die aerobe Glykogen-Phosphorolyse nur gering, da durch das Basanowski-Enzym keine vollständige Gleichgewichtseinstellung erfolgte.

Die bisherigen Versuche zeigten, daß die Beschleunigung der aeroben Glykogen-Phosphorolyse durch DPNH (Abb. 11) nicht auf einer Verschiebung des Fließgleichgewichts infolge vermehrter Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure beruht. Die aerobe durch DPNH gesteigerte Glykogen-Phosphorolyse kann erklärt werden durch Zunahme an aktivem Enzym infolge einer Oxydoreduktion am Enzym-System der Phosphorylase. In diese Oxydoreduktion greifen verschiedene Redoxkatalysatoren ein; das Diphosphopyridin-nuclotid-System und Wasserstofftransportmetaboliten offensichtlich von der Art des Glycerophosphatzyklus, die ein notwendiges Bindeglied zu den Redoxsystemen der Atmungskette darstellen.

Bedeutung der Wasserstofftransportmetaboliten für die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse

Aus den bisher durchgeführten Arbeiten haben sich Anhaltspunkte ergeben, daß in den Mechanismus der reduktiven Aktivierung und der oxydativen Inaktivierung des Phosphorylase-Systems der Glycerophosphatzyklus mit einbezogen ist. Er wäre das zu fordernde Bindeglied zwischen dem cytoplasmatischen Pyridinnucleotid-System, das die unmittelbare Oxydoreduktion vollzieht, und der mitochondrialen Atmungskette. Die folgenden Versuche sollen die Bedeutung der Wasserstofftransportmetaboliten und vor allem die des Glycerophosphatzyklus für die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse aufzeigen.

Wir untersuchten zunächst, welchen Einfluß eine Unterbrechung des Wasserstofftransports von den Pyridinnucleotiden zu den Flavinenzymen durch Amytal auf die aerobe Glykogen-Phosphorolyse ausübt. $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal (Abb. 16-18) hemmt die Atmungsaktivität zu 73 %, trotzdem nimmt die Geschwindigkeit der aeroben Glykogen-Phosphorolyse (Abb. 22-23) nur um 40 %, die Milchsäurebildung um 60 % zu. Die Beschleunigung des Glykogenabbaus kann so erklärt werden: der Wasserstofftransport aus dem Cytoplasma zur mitochondrialen Atmungskette oder in umgekehrter Richtung wird durch Amytal so blockiert, daß das Redox-potential des Diphosphopyridinnucleotid-Systems im Cytoplasma zur negativen Seite hin verschoben wird. Dies wäre der Fall, wenn die Mitochondrien für DPNH mehr oder weniger durchlässig geworden sind, oder eine pyridinnucleotidabhängige Wasserstoffbrücke vom Typ des β -Hydroxybutyrat oder des Isocitrat-Oxydationszyklus existiert.

Diese Zyklen (109-111) würden ähnlich wie der Glycero-phosphatzyklus den Wasserstoff aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien überführen. Den Ablauf stellt man sich folgendermaßen vor: Im cytoplasmatischen Raum wird ein Substrat von DPNH mittels einer Dehydrogenase reduziert, dieses reduzierte Substrat gelangt in die Mitochondrien, wird hier durch eine DPN-abhängige Dehydrogenase oxydiert und wandert wieder in das Cytoplasma. Für β -Hydroxybuttersäure konnte bisher nur eine intramitochondriale Dehydrogenase (112 und 113) gefunden werden, während Isocitronensäure-Dehydrogenasen (114) sowohl intra- als auch extramitochondrial nachgewiesen wurden.

Bei Anwendung von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal (Abb. 22 und 23) bleibt eine 60%ige aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse bestehen; offensichtlich ist unter diesen Bedingungen keine vollständige Aktivierung der Phosphorylase eingetreten. Man muß somit annehmen, daß die hierzu erforderliche Verschiebung des DPN/DPNH-Redoxsystems zur reduzierten Stufe nicht weitgehend genug erfolgen kann, da noch andere Reaktions-

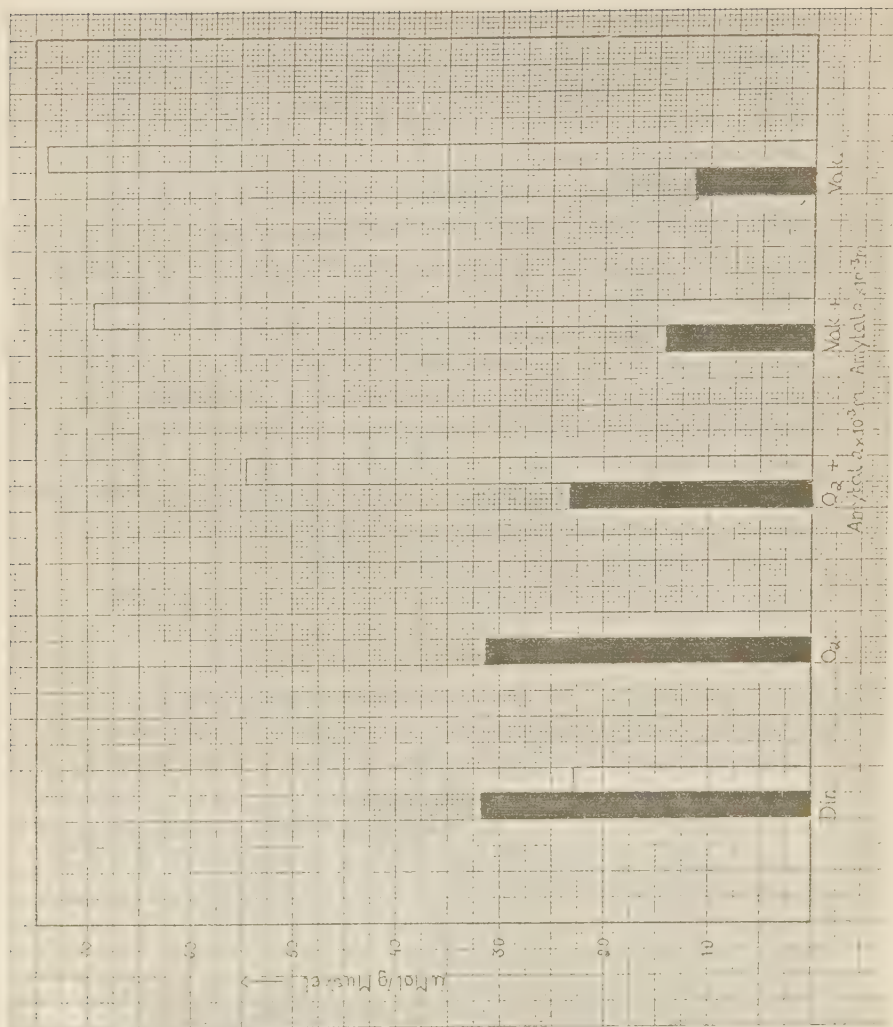


Abb. 22 Glykogen- und Milchsäure-Konzentration in Muskelfaser-Fragmenten unter Inaktivierung des Wasserstofftransportes von den Pyridinnucleotiden zu den Flavinenzymen mit Amytal. (Mittelwerte aus je 5 Analysen) Glykogenkonzentration (in μMol Glucose; schwarze Säulen) und Milchsäurekonzentration (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.) nach 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff (O_2) bzw. in O_2 und $2 \times 10^{-3}\text{m}$ Amytal; im Vak. bzw. im Vak. und $2 \times 10^{-3}\text{m}$ Amytal.

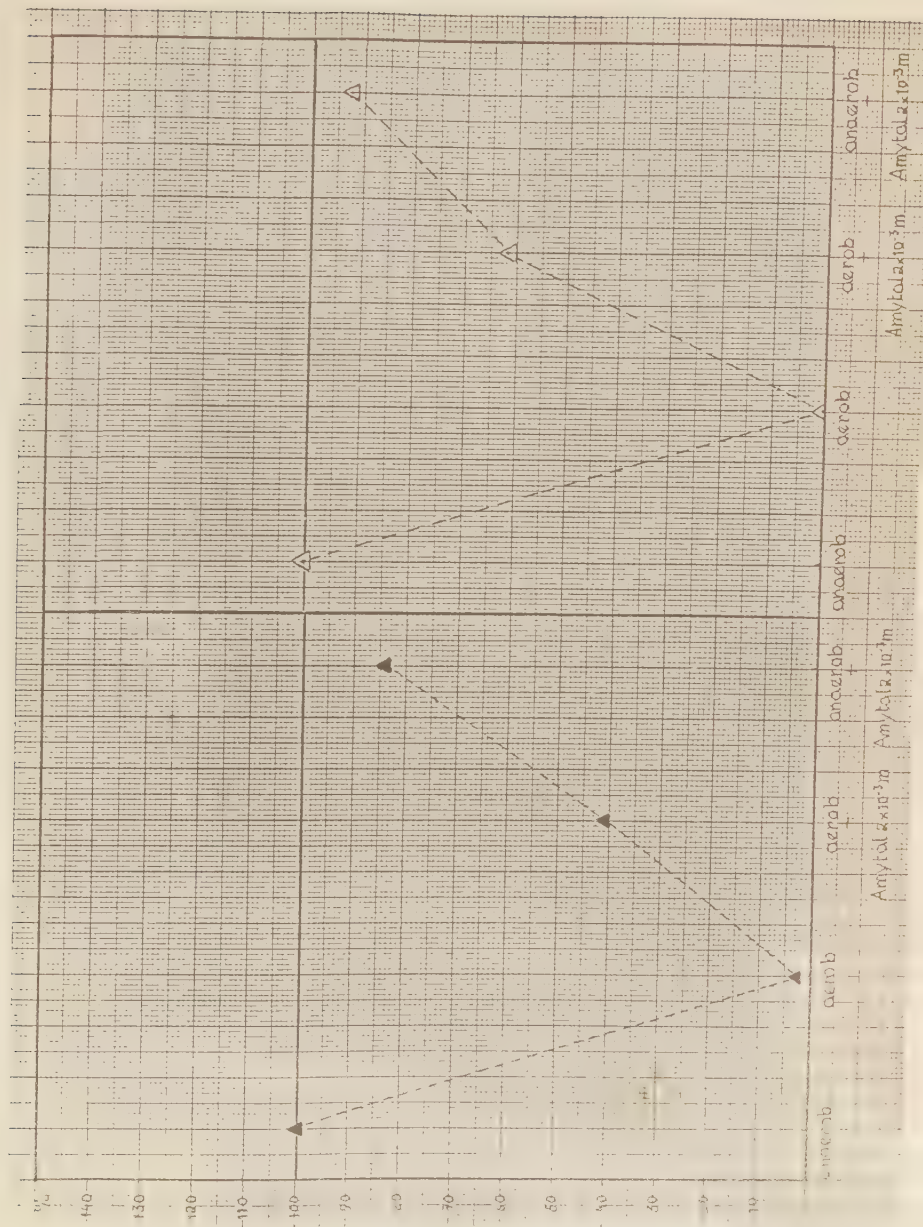


Abb. 23 Glykogenabbau $\blacktriangle$ und Milchsäurebildung $\triangle$ 100 % = die Differenz der Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vak. minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 22 dargestellt.

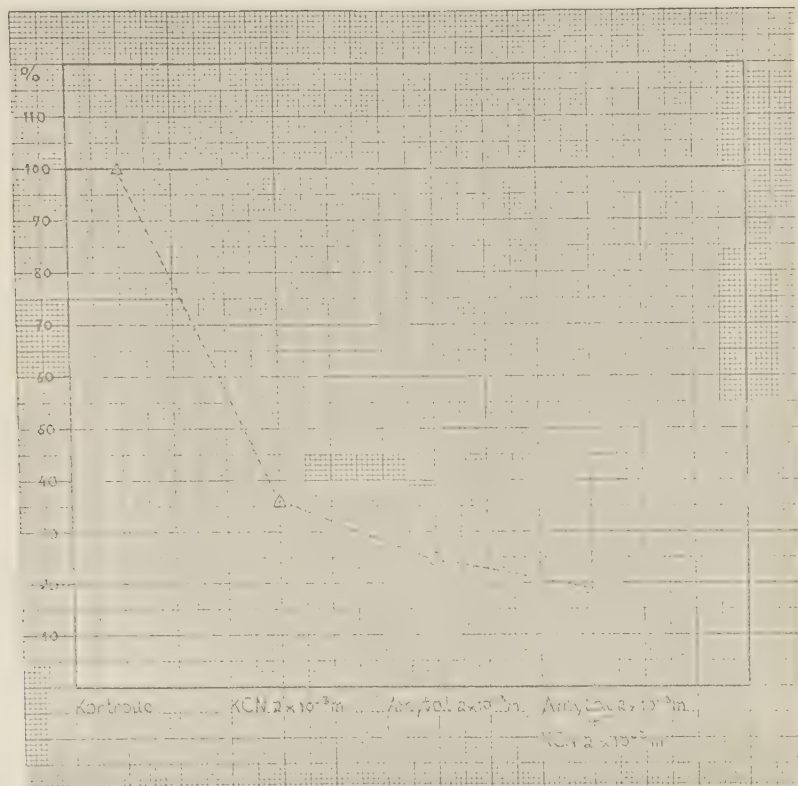


Abb. 24 Gewebeatmung der Muskelfaser-Fragmente nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} m$ KCN; $2 \times 10^{-3} m$ Amytal; $2 \times 10^{-3} m$ Amytal und $2 \times 10^{-3} m$ KCN.
Kontrollversuch: $16,7 \mu Mol O_2$ Verbrauch/g Muskel = 100 % (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

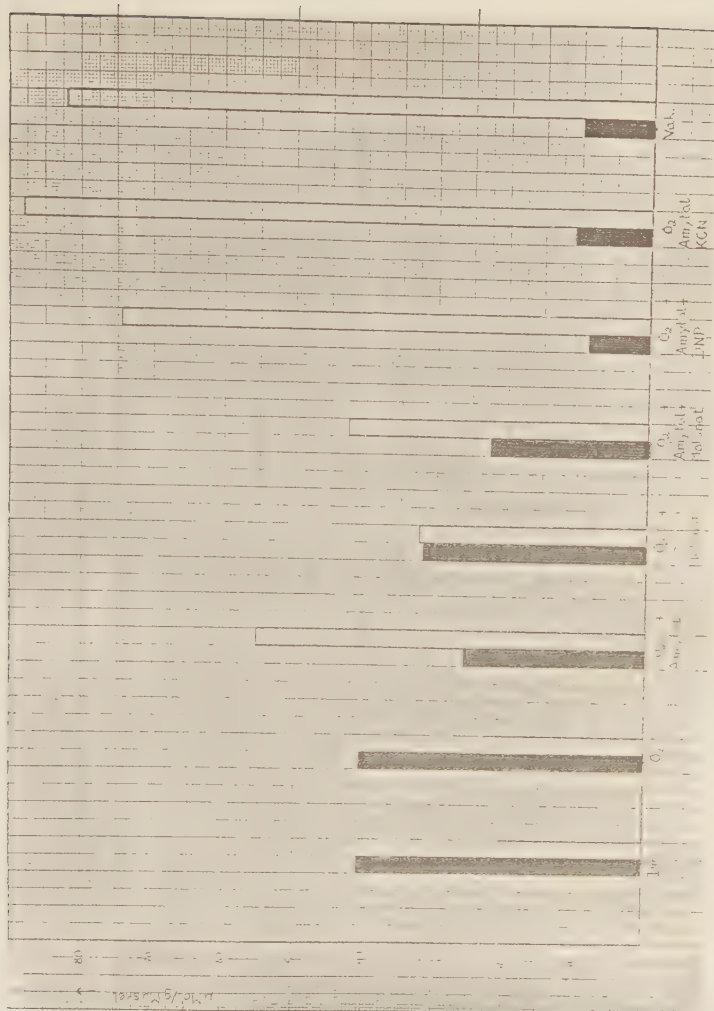


Abb. 25 Glykogen- und Milchsäurekonzentration in Muskelfaser-Fragmenten bei Unterbrechung der Reaktionsfolge verschiedener Stoffwechselzyklen (Mittelwerte aus je 4 Analysen). Glykogen- (in $\mu\text{Mol Glucose}$; schwarze Säulen) und Milchsäurekonzentration (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.) nach 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff (O_2); O_2 u. $2 \times 10^{-3}\text{m Amytal}$; O_2 u. $1 \times 10^{-1}\text{m Malonat}$; O_2 u. $2 \times 10^{-3}\text{m Amytal}$ u. $1 \times 10^{-1}\text{m Malonat}$; O_2 u. $2 \times 10^{-3}\text{m Amytal}$ u. $1 \times 10^{-4}\text{m DNP}$; O_2 u. $2 \times 10^{-3}\text{m Amytal}$ u. $2 \times 10^{-3}\text{m KCN}$; im Vak.

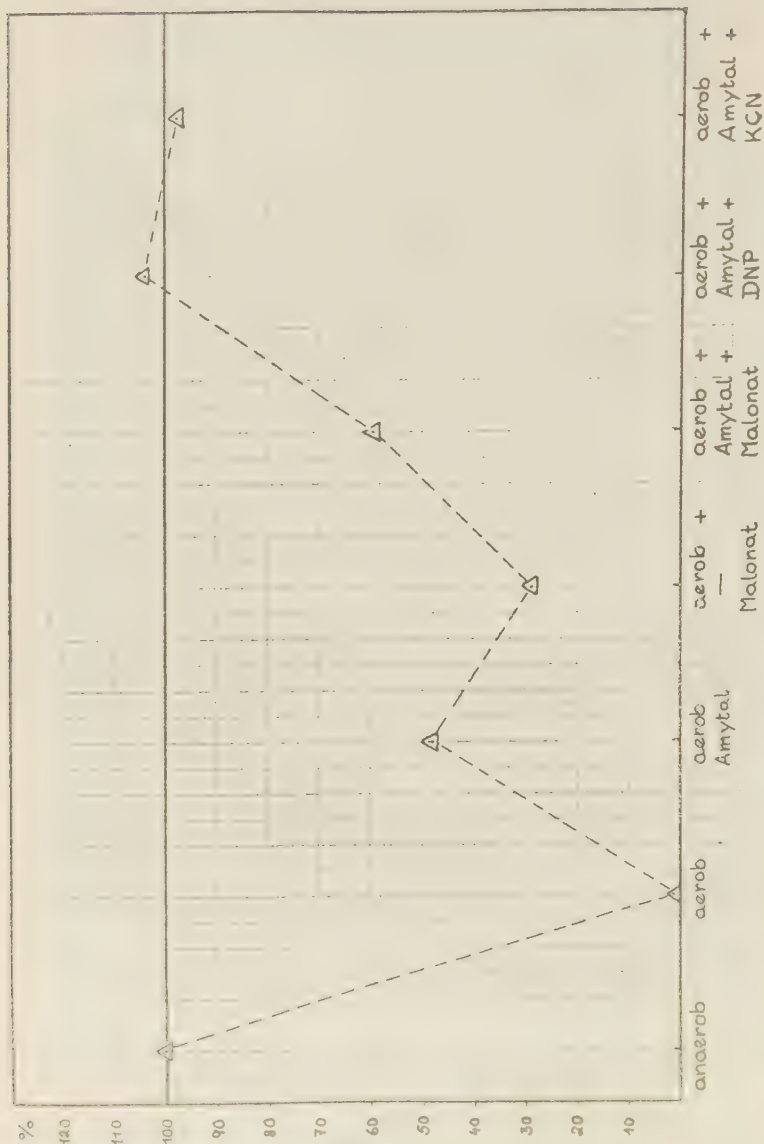


Abb. 26 Glykogenabbau unter dem Einfluß verschiedener Stoffwechsellinhibitoren: 100 % = die Differenz der Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vak. minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 25 dargestellt.

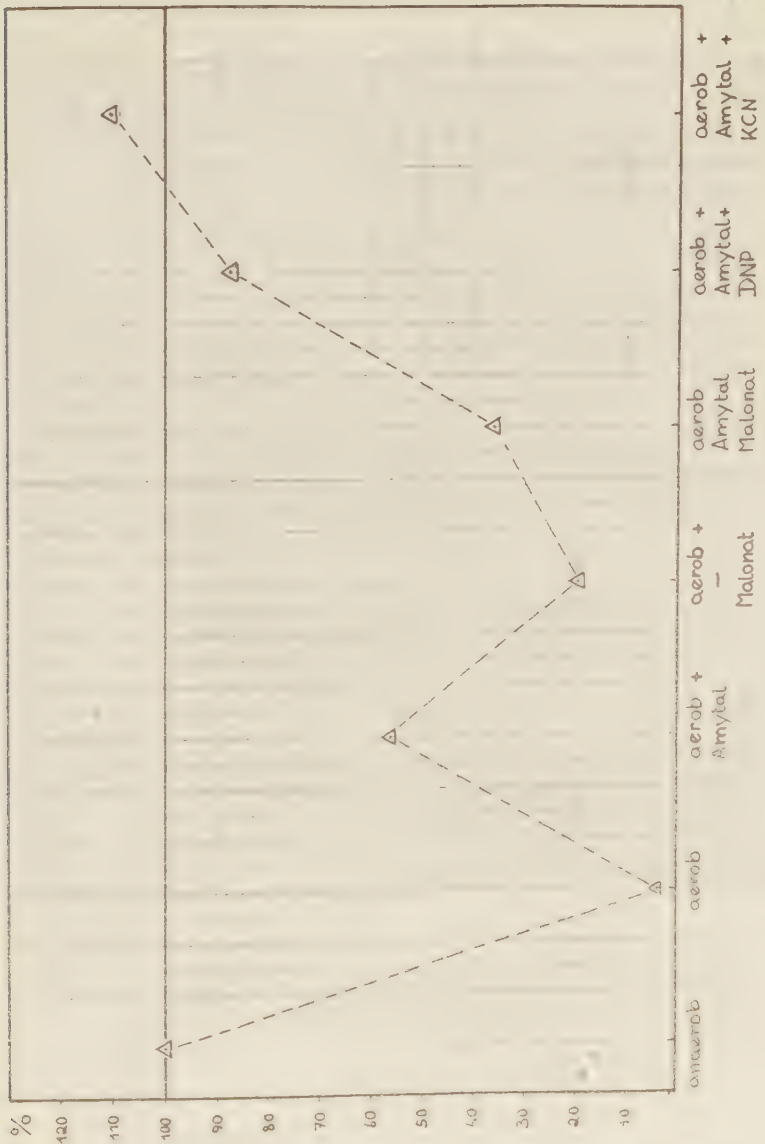


Abb. 27 Milchsäurebildung unter dem Einfluß verschiedener Stoffwechsellinhibitoren: 100 % = die Differenz der Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vak. minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 25 dargestellt.

wege für den Wasserstofftransport aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien existieren, die mit Amytal nicht hemmbar sind. Eine zusätzliche Blockierung des Warburgschen Atmungsferments mit $2 \times 10^{-3} \text{ m KCN}$ (Abb. 24) senkt die Gewebeatmung nur noch um 6 %, während die Glykogen-Phosphorolyse auf 100 % (Abb. 25+26), die Milchsäurebildung auf 110 % (Abb. 25+27) der unter anaeroben Bedingungen mit 100 % festgelegten Werte steigt.

Eine zusätzliche Hemmung der Succinodehydrogenase mit $1 \times 10^{-1} \text{ m Malonat}$ hat keine wesentliche Steigerung der Glykogen-Phosphorolyse zur Folge.

Betrachtet man zunächst die Atmungsaktivität so wird die Gewebeatmung bei Zusatz von $1 \times 10^{-1} \text{ m Malonat}$ um 50 % und bei Zusatz von $1 \times 10^{-2} \text{ m Malonat}$ um 70 % gesenkt (Abb. 28).

Tabelle 8 Gewebeatmung in $\mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/g Muskel nach 2 Stdn. Inkubation bei 22° C
Mittelwerte aus je 4 Experimenten.

I		II		III		IV	
mit Substrat	$\mu\text{Mol O}_2$	mit Substrat + Malonat	$\mu\text{Mol O}_2$	ohne Substrat	$\mu\text{Mol O}_2$	I-III= 100%	II-III=X%
Succinat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$	32,1	Succinat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ + Malonat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$	16,5	Malonat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$	7,7	100%	36%
Succinat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$	32,1	Succinat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ + Malonat $1 \times 10^{-2} \text{ m}$	24,7	Malonat $1 \times 10^{-1} \text{ m}$	4,7	100%	63%

Setzt man dem mit $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ bzw. $1 \times 10^{-2} \text{ m}$ Malonat blockierten System $1 \times 10^{-1} \text{ m Succinat}$ zu, so sinkt die Atmungsaktivität zu 64 % bzw. 27 % gehemmt (Abb. 29+30, Tab. 8).

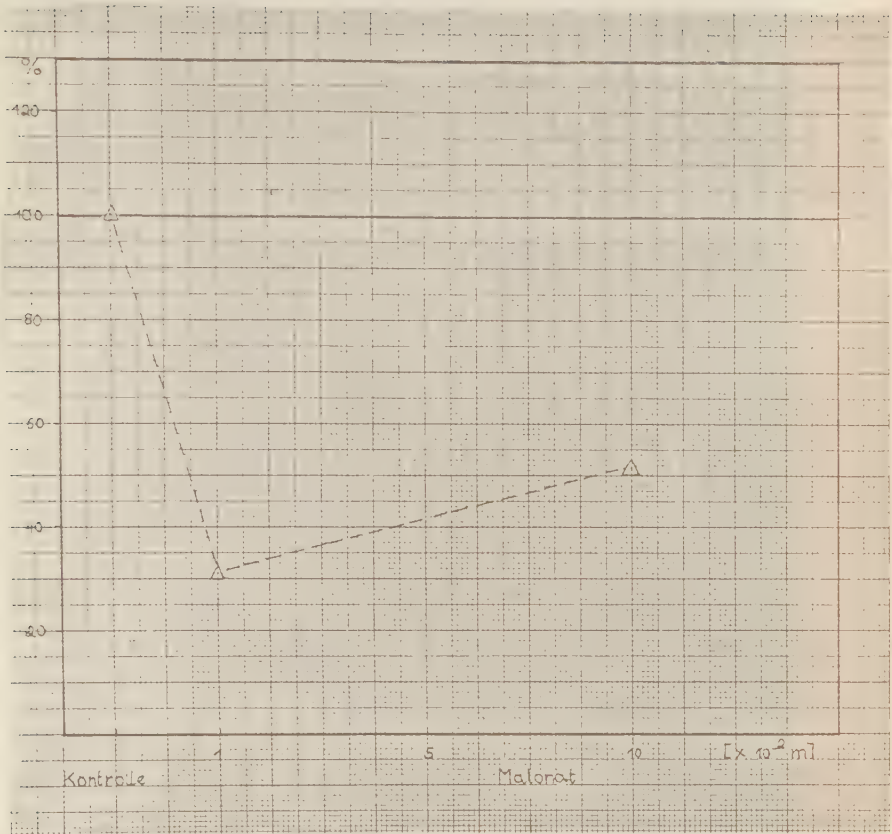
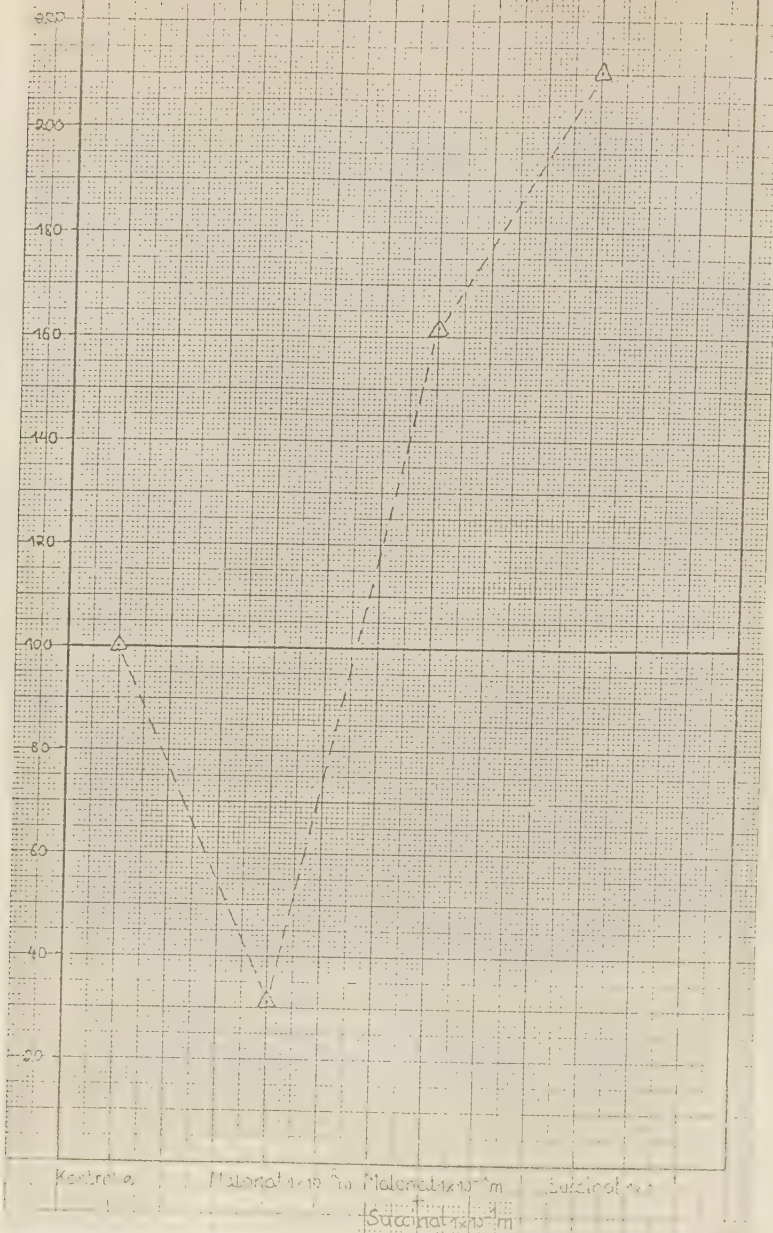


Abb. 28 Gewebeatmung der Muskelfaser-Fragmente nach 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von Malonat. Kontrollversuch: $15,3 \mu\text{Mol O}_2\text{Verbrauch/g Muskel} = 100 \%$ (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).



29 Gewebeatmung der Muskelfaser-Fragmente nach 2 stdg.
 Inkubation bei Zusatz von $1 \times 10^{-2}m$ Malonat;
 $1 \times 10^{-2}m$ Malonat und $1 \times 10^{-1}m$ Succinat; $1 \times 10^{-1}m$
 Succinat.
 Kontrollversuch: $15,3 \mu\text{Mol O}_2\text{Verbrauch/g Muskel} =$
 100% (Mittelwert aus je 4 Experimenten).

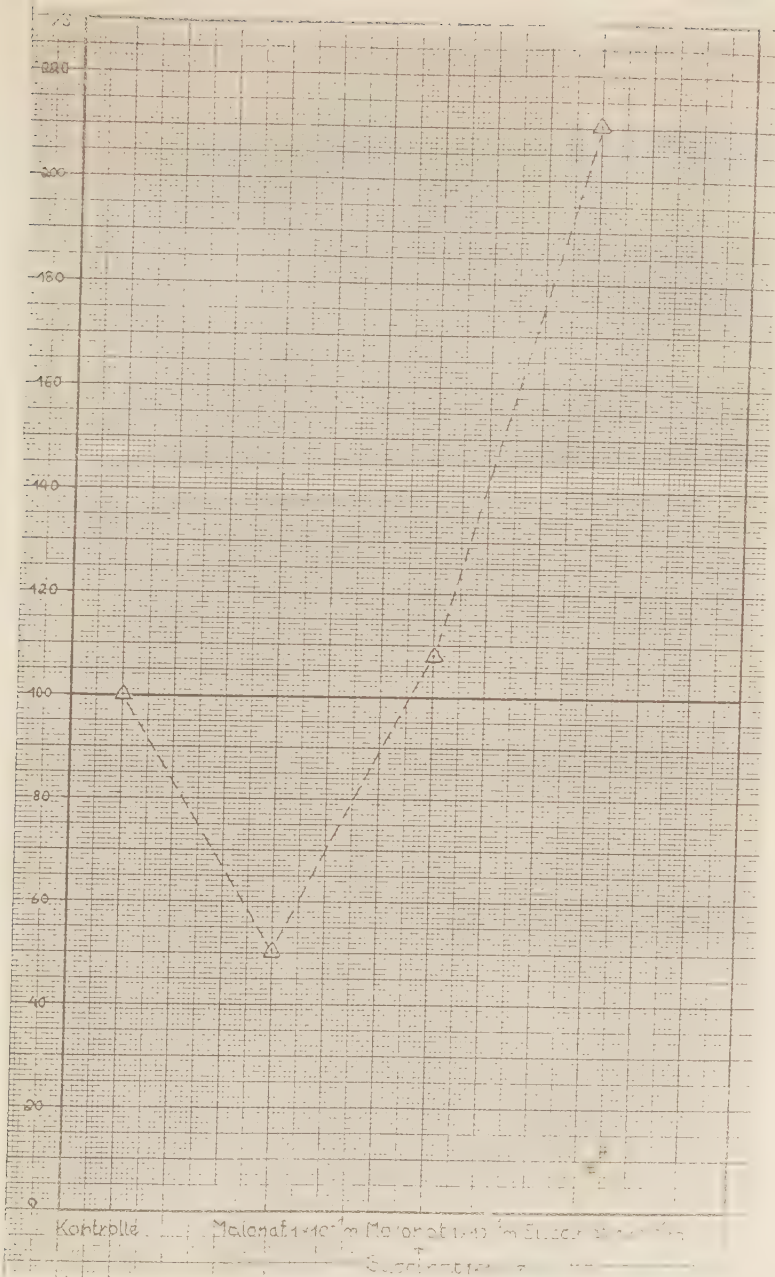


Abb. 30 Gewebeatmung der Muskelfaser-Präparation
 2 stdg. Inkubation bei Zusatz von 1×10^{-4} m
 Malonat; 1×10^{-3} m Malonat und 1×10^{-3}
 Succinat; 1×10^{-3} m Succinat.
 Kontrollversuch: $15,3 \mu\text{Mol O}_2$ Verbrauch/g Muskel =
 100 % (Mittelwerte aus je 4 Experimenten).

Die Glykogen-Phosphorolyse beträgt bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal 48 %, bei $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ Malonat 28 %, bei Zusatz von $2 \times 10^{-3} \text{ m}$ Amytal und $1 \times 10^{-1} \text{ m}$ Malonat 59 % (Abb. 25+26). Vergleicht man den Glykogenabbau bei Zusatz von Amytal und Malonat und bei Zusatz von Amytal allein so nimmt die Glykogen-Phosphorolyse um 11 % zu; die unter den selben Bedingungen analysierten Milchsäurewerte sind in Abb. 25 und 27 dargestellt.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der postulierte Wasserstofftransport zwischen Cytoplasma und Mitochondrien über den Glycerophosphatzyklus verläuft, der als Wasserstoffbrücke auch bei Gegenwart von Amytal funktioniert. Wird nun diese Wasserstoffbrücke durch einen Überschuß an α -Glycerophosphat ($1 \times 10^{-1} \text{ m}$) unwirksam, die Reaktion von Dihydroxyacetonphosphat zu α -Glycerophosphat wird weitgehend ins Gleichgewicht gestellt, so steigt die aerobe Glykogen-Phosphorolyse auf 47 %, mit Amytal auf 76 % (Abb. 31+32) der unter anaeroben Bedingungen mit 100 % festgelegten Werte.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß für die Oxydoreduktionsvorgänge am Enzymsystem der Phosphorylase, durch die die Aktivität des Enzymsystems gesteuert wird, neben den Diphosphopyridinnucleotiden auch Wasserstofftransportmetaboliten von der Art des Glycerophosphatzyklus von Bedeutung sind. Der Glycerophosphatzyklus stellt ein notwendiges Bindeglied zu den Redoxsystemen der Atmungskette dar, worin offensichtlich seine biologische Bedeutung begründet ist.

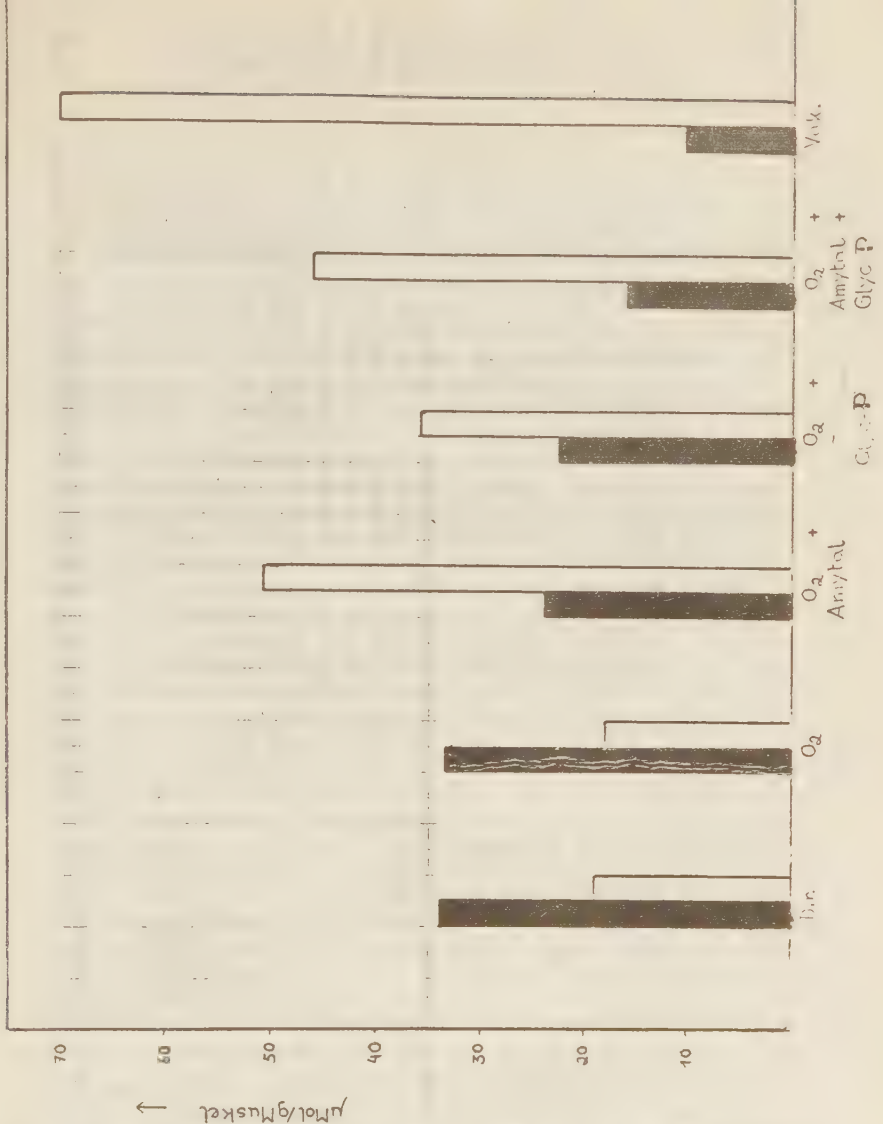


Abb. 31 Glykogen- und Milchsäurekonzentration in Muskelfaser-Fragmenten unter Inaktivierung des Wasserstofftransportes von den Pyridinnucleotiden zu den Flavinyenzymen mit Amytal und bei Zusatz von α -Glycerophosphat (Glyc.-P-) (Mittelwerte aus je 4 Analysen). Glykogen- (in μMol Glucose; schwarze Säulen) und Milchsäurekonzentration (leere Säulen) zu Versuchsbeginn (Dir.) nach 2 stdg. Inkubation in Sauerstoff (O₂); O₂ und $2 \times 10^{-3}\text{m}$ Amytal; O₂ und $1 \times 10^{-1}\text{m}$ Glyc.-P-; O₂ und $2 \times 10^{-3}\text{m}$ Amytal und $1 \times 10^{-1}\text{m}$ Glyc.-P-; und im Vak.

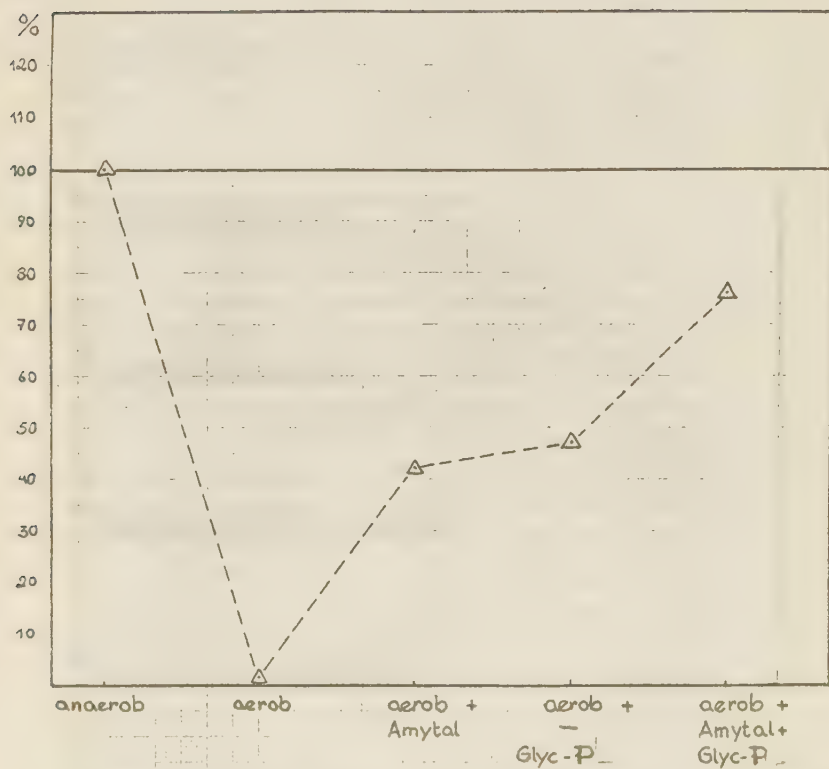


Abb. 32 Glykogenabbau unter dem Einfluß von Amytal und α -Glycerophosphat:
 100 % = die Differenz in Analysenwerte nach 2 stdg. Inkubation im Vak. minus der Kontrollwerte zu Versuchsbeginn. Die Analysenwerte sind in Abb. 31 dargestellt.

Diskussion

Eine Steuerung des Glykogenabbaues wird durch Änderung der Phosphorylaseaktivität erreicht. Sehr wahrscheinlich kommt eine Aktivitätsänderung der Phosphorylase durch Oxydoreduktionsvorgänge zustande, in die eine Reihe von Redoxsysteme, einschließlich der in der Atmungskette lokalisierten, einbezogen sind. Das Verhältnis DPN/DPNH bestimmt die Menge an aktivem Enzym, eine Zunahme des reduzierten Pyridinnucleotid hat eine vermehrte Phosphorylaseaktivität zur Folge; als vermittelndes Bindeglied für den Wasserstofftransport zwischen Cytoplasma und mitochondrialer Atmungskette dient der Glycerophosphatzyklus eventuell auch der β -Hydroxybutyrat- u. Isocitrat-Oxydationszyklus. Die Verminderung an aktiver Phosphorylase kann man sich folgendermaßen vorstellen: Entweder wird die Phosphorylase selbst durch Oxydation ihrer SH-Gruppen inaktiviert, oder aber durch Oxydoreduktionsvorgänge an der Phosphorylasekinase. Wird die Aktivität der Phosphorylasekinase so weitgehend verändert, daß die Phosphorylase-Phosphataseaktivität überwiegt, so ist eine Abnahme der Phosphorylase a die Folge. Anhaltspunkte für eine Inaktivierung der Phosphorylasekinase bieten die Arbeiten von Parmeggiani (69-72) (115-117), in denen sie als Angriffsort für hormonelle Regulationen die Phosphorylasekinase ermittelten; außerdem fanden sie aerob die Aktivität der Phosphorylase a vermindert, wofür bisher noch keine Erklärung gegeben wurde.

In dieser Arbeit wurde ein Prinzip der Selbstregulation des Kohlenhydratstoffwechsels dargestellt, das auch für andere ähnliche Systeme zum Beispiel, das der Hexokinase und Phosphofructokinase von Bedeutung sein kann.

Dieser Mechanismus ist unter den gegebenen Bedingungen weder von der Substratkonzentration noch von effektorischen Wirkungen des Adenylsäuresystems und Orthophosphats, denen Lynen (31-32, 34-39) Holzer (40-47), Johnson (33) und Chance und Hess (55-65) eine regulierende Wirkung im Kohlenhydratstoffwechsel zuschreiben, abhängig.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen über die aerobe Hemmung der Glykogen-Phosphorolyse haben gezeigt, daß für die Regulation dieser Reaktion ein Mechanismus von Bedeutung ist, der auf einer Oxydoreduktion am Enzym-System der Phosphorylase beruht. An dieser Oxydoreduktion nimmt unmittelbar das Pyridin-nucleotid-System teil. Als notwendiges Bindeglied zu den Redoxsystemen der Atmungskette wurden solche Wasserstofftransportmetaboliten erkannt, die Reaktionszyklen von der Art des Glycerophosphatzyklus aufbauen. Mit dem geschilderten Reaktionsmechanismus kann man die Regulation der Glykogen-Phosphorolyse, die als Pasteur Effekt in Erscheinung tritt, unabhängig von der eventuellen Bedeutung der sog. Effektoren für diesen Vorgang vollständig erklären.

Literatur

- 1 L. Pasteur, Bull. Soc. Chimique, Paris, 28, VI p. 79, 1861.
- 2 K. Monbart, "Louis Pasteur" Strassburg 1902.
- 3 F. Lieben, Geschichte d. Phys. Chemie, Leipzig 1935.
- 4 O. Warburg, Biochem. Z. 172, 432, 1926.
- 5 F. Lynen, 8. Colloquium d. Gesellschaft f. Phys. Chemie, Mosbach/Baden, Mai 1957, Springer-Verlag.
- 6 R. Wagner, Z. Biol. 83, 59, 1925.
- 7 R. Wagner, Z. Biol. 83, 120, 1925.
- 8 R. Wagner, Z. Biol. 86, 367, 1927.
- 9 R. Wagner, Z. Biol. 86, 397, 1927.
- 10 R. Wagner, "Probleme und Beispiele biologischer Regelung", G. Thieme, Stuttgart 1954.
- 11 R. Wagner, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 228, 6, 1956.
- 12 R. Wagner, Naturwissenschaften 48, 235, 1961.
- 13 R. Wagner, Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. 25, 3, 1959.
- 14 R. Wagner, Mitt. d. Ges. dtsh. Naturforscher und Ärzte Nr. 1, S. 5.
- 15 R. Wagner, Naturwissenschaften 48, 11, 1961.
- 16 Physiologische Chemie, Hrsg. B. Flaschenträger und E. Lehnartz II 2c, 402-421, 1959
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 17 V.R. Potter, Cancer Res. 11, 565, 1951.
- 18 R.E. Olson, Cancer Res. 11, 571, 1951.
- 19 O. Warburg, Über den Stoffwechsel von Tumoren. Berlin 1926.
- 20 G.A. Le Page, Cancer Res. 8, 193, 1948.
- 21 P. Emmelot, C.I. Bos und B.I. Brombacher, Brit. I. Cancer 10, 188, 1956.
- 22 P. Emmelot, and P.I. Brombacher, Biochim. biophysica Acta, N.Y. 21, 581, 1956.
- 23 N. Weissenfels, Z. Naturforschg. 12b, 168, 1957.
- 24 N. Weissenfels, Strahlentherapie, Sonderbd. 37, 102, 1957.
- 25 A.C. Aisenberg und van R. Potter, J. of Biol. Chem. 224, 1115, 1957.

- 26 A. Hahn, Z. Biol. 91, 53, 1930.
- 27 A. Hahn, Z. Biol. 91, 491, 1931.
- 28 A. Hahn, Z. Biol. 92, 535, 1932.
- 29 O. Warburg, Biochem. Z. 177, 471, 1926.
- 30 O. Warburg, Katalytische Wirkung der lebenden Substanz, Berlin 1928.
- 31 F. Lynen, Liebig's Ann. 546, 120, 1941.
- 32 F. Lynen, Naturwissenschaften 30, 398, 1942.
- 33 M.I. Johnson, Science (Lancaster, Pa.) 94, 200, 1941.
- 34 F. Lynen, Proc. 3. Internat. Congress of Biochemistry, Brüssel 1955, p. 315.
- 35 F. Lynen, Proc. of the Internat. Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, p. 9.
- 36 F. Lynen, Ciba Foundation Symposium on Regulation of Cell Metabolism I. u. A. Churchill, Ltd. London, England 1959, p. 256.
- 37 F. Lynen u. H. Holzer, Liebig's Ann. 563, 213, 1949.
- 38 F. Lynen u. R. Koenigsberger, Liebig's Ann. 569, 129, 1950.
- 39 F. Lynen u. R. Koenigsberger, Liebig's Ann. 573, 60, 1951.
- 40 H. Holzer, Liebig's Ann. 564, 234, 1949.
- 41 H. Holzer, u. F. Lynen, Liebig's Ann. 569, 138, 1950.
- 42 H. Holzer u. E. Holzer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 232, 1953.
- 43 H. Holzer u. H.W. Goedde, Biochem. Z. 329, 175, 1957.
- 44 H. Holzer, I. Witt u. R. Freytag-Hilf, Biochem. Z. 329, 467, 1958.
- 45 H. Holzer, I. Witt, Biochem. Z. 330, 545, 1958.
- 46 H. Holzer u. R. Freytag-Hilf, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 7, 1959.
- 47 H. Holzer u. H. Grunicke, Biochim. biophysica Acta 53, 591, 1961.
- 48 S. Gatt, Federation Proceedings 16, 184, 1957.
- 49 R. Wu u. E. Racker, Federation Proceedings 16, 274, 1957.
- 50 S. Gatt u. E. Racker, J. of Biol. Chem. 234, 1015, 1959.
- 51 S. Gatt u. E. Racker, J. of Biol. Chem. 234, 1024, 1959.
- 52 R. Wu u. E. Racker, J. of Biol. Chem. 234, 1029, 1959.

- 53 R. Wu u. E. Racker, J. of Biol. Chem. 234, 1038, 1959.
- 54 R. Wu, J. of Biol. Chem. 240, 2373, 1965.
- 55 B. Chance u. B. Hess, Naturwissenschaften 46, 248, 1959.
- 56 B. Chance, Ciba Foundation, Regulation of Cell Metabolism 1959, p. 91.
- 57 B. Chance u. B. Hess, Science 129, 700, 1959.
- 58 B. Chance u. B. Hess, J. of Biol. Chem. 234, 2404, 1959.
- 59 B. Chance u. B. Hess, J. of Biol. Chem. 234, 2413, 1959.
- 60 B. Chance u. B. Hess, J. of Biol. Chem. 234, 2416, 1959.
- 61 B. Chance u. B. Hess, J. of Biol. Chem. 234, 2421, 1959.
- 62 B. Chance, D. Garfinkel, I. Higgins, B. Hess, J. of Biol. Chem. 235, 2426, 1960.
- 63 B. Hess, Dtsch. Med. Wschr. 13, 668, 1963.
- 64 B. Hess, Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Wissenschaftl. Konf. d. Ges. dtsh. Naturforscher u. Ärzte, Rottach-Egern 1962, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.
- 65 D. Garfinkel u. B. Hess, J. of Biol. Chem. 239, 971, 1964.
- 66 E. Meyer, P.M. Reiser u. Brigitte v. Kuhenheim, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 143, 1963.
- 67 P. Karlson, Kurzes Lehrbuch d. Biochem. Georg Thieme-Verlag Stuttgart 1961, S. 255.
- 68 M. Cornblath, H.E. Morgan, P.I. Randle, Federation Proc. 20, 85, 1961.
- 69 M. Cornblath, P.I. Randle, A. Parmeggiani u. H.E. Morgan, J. of Biol. Chem. 238, 1592, 1963.
- 70 H.E. Morgan u. A. Parmeggiani, Biochem. J. 89, 39, 1963.
- 71 H.E. Morgan u. A. Parmeggiani, J. of Biol. Chem. 239, 2435, 1964.
- 72 H.E. Morgan u. A. Parmeggiani, J. of Biol. Chem. 239, 2440, 1964.
- 73 I.V. Passonneau u. O.H. Lowry, Advances in Enzyme Regulation. Edited by George Weber, Vol. 2, p. 265.
- 74 F. Lipmann, Biochem. Z. 265, 133, 1933.
- 75 F. Lipmann, Biochem. Z. 268, 205, 1934.
- 76 F. Lipmann, Nature 143, 436, 1939.
- 77 F. Lipmann, Symposium on Respiratory Enzyms, Madison 1942, p. 48.
- 78 I.F. Turner u. L.W. Mapson, Nature 181, 270, 1958.

- 79 M.D. Hatch u. I.F. Turner, Biochem. J. 69, 495, 1958.
- 80 M.D. Hatch u. I.F. Turner, Biochem. J. 72, 524, 1959.
- 81 M.D. Hatch u. I.F. Turner, Biochem. J. 75, 67, 1960.
- 82 A.C. Aisenberg, B. Reniafarje u. van R. Potter, J. of Biol. Chem. 224, 1099, 1957.
- 83 A.C. Aisenberg, B. Reniafarje u. van R. Potter, J. of Biol. Chem. 224, 1115, 1957.
- 84 A.C. Aisenberg, J. of Biol. Chem. 234, 441, 1959.
- 85 R. Balâzs u. B. Richter, Biochem. J. 68, 5p, 1958.
- 86 R. Balâzs u. B. Richter, Biochem. J. 69, 57p, 1958.
- 87 R. Balâzs, Intern. Congr. Biochem., 4th Meeting 1958, p 73.
- 88 R. Balâzs, Biochem. J. 72, 561, 1959.
- 89 R. Balâzs u. D. Richter, Biochem. J. 74, 30p, 1960a.
- 90 R. Balâzs u. D. Richter, Biochem. J. 76, 67p, 1960b.
- 91 R. Balâzs u. D. Richter, Biochem. J. 86, 494, 1936.
- 92 W.W. Umbreit, R.H. Burris u. I.F. Stauffer, "Manometr. Techn. and Tissue Metabolism", Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minn. 1948.
- 93 A. Hahn, "Einführung in die physiolog. chem. Arbeitsmethoden", S. 50, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1936.
- 94 Biochemica "Boehringer", Blutzucker, Art. TC-M-I 15982.
- 95 E. Friedemann, O. Cotonio u. G. Shaffer, J. Biol. Chem. 73, 334, 1927.
- 96 Biochemica "Boehringer" Milchsäure-Test Art. TC-B 15972.
- 97 E. Meyer u. G. Seidel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 262, 1962.
- 98 Biochemica "Boehringer" ATP-Test, Art. TC-I 15979.
- 99 H. Weil-Malherbe u. A.D. Bone, Biochem. J. 49, 339, 1951.
- 100 C.F. Cardini, Enzymologia (Den Haag) 14, 362, 1950/51.
- 101 R.K. Crane u. H. Sols, J. of Biol. Chem. 203, 273, 1953.
- 102 H. Laser, Biochem. J. 31, 1671, 1937.
- 103 T. Bücher u. M. Klingenberg, Z. Angew. Chem. 70, 552, 1958.
- 104 B. Chance, Henry Ford Hospital Intern. Symp. No. 4, 447, 1956.
- 105 Methods in Enzymology, Academic Press New York IV, 280, 1957.
- 106 L. Ernster, O. Jalling, H. Löw and O. Lindberg, Exptl. Cell Research Suppl. 3, 124, 1955.
- 107 B. Chance u. G. Hollmeyr, J. of Biol. Chem. 238, 418, 1963.

- 108 L. Packer, R.W. Estabrook, T.P. Singer and T. Kiruma,
J. of Biol. Chem. 235, 535, 1960.
- 109 Advances in Enzymology, Interscience Publishers, INC
New York; Interscience Publishers, LTD London
23, 345, 1961.
- 110 T.M. Delvin and B.H. Bedell, Biochim. Biophys. Acta
36, 565, 1959.
- 111 T.M. Delvin and B.H. Bedell, J. of Biol. Chem. 235,
2134, 1960.
- 112 H. Beaufay, D.S. Bendall, P. Bandhuin and C. de Duve,
Biochem. J. 73, 623, 1959.
- 113 A.L. Lehninger, H.C. Sudduth and I.B. Wise,
J. of Biol. Chem. 235, 2450, 1960.
- 114 I.M. Lowenstein and S.B. Smith, Biochim. Biophys. Acta,
56, 385 1962.
- 115 K.E. Hammermeister, A.A. Ynis und E.G. Krebs,
J. of biol. Chem. 240, 986, 1965.
- 116 I.B. Posner, R. Stern und E.G. Krebs, J. of biol. Chem.
240, 982, 1965.
- 117 W.H. Ranforth, E. Helmreich und C.F. Cori, Proc. of
the Nat. Academy of Science 48, 1191, 1962.

Lebenslauf

Am 6.I.1940 wurde ich, Barbara, Hildegard, Käte v. Bock und Polach, als Tochter des Dr. med. Kurt v. Bock und Polach und seiner Ehefrau Dr. med. Ursula geb. Heinrich in Görlitz geboren. Meine erste Kindheit verbrachte ich in Breslau. Im Februar 1945 kam ich nach Au/Hallertau und besuchte dort von 1946 bis 1950 die Volksschule. Im Herbst 1950 trat ich in die Internatsschule des Max-Josef Stifts in München ein und legte an dieser Schule 1959 die Reifeprüfung ab. Im Herbst 1959 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität München. Nach dem 2. Semester bestand ich die naturwissenschaftliche nach dem 5. Semester die ärztliche Vorprüfung. Das Studium beendete ich am 15.12.1965 mit ärztlichem Staatsexamen in München. Vom 1.I.66 bis 31.III.66 war ich als Medizinalassistentin am Physiologisch-chem. Institut der Universität München, vom 1.IV.66 bis 30.XI.66 auf der Chirurg. Abteilung des Krankenhauses München-Nymphenburg, seit dem 1.XII.66 bin ich auf der Internen Abteilung desselben Krankenhauses tätig.

